

# **Untersuchungen zur Rolle von Connexin31 bei der murinen Plazentaentwicklung**

Inaugural-Dissertation

zur  
Erlangung des Doktorgrades  
Dr. rer. nat.

des Fachbereichs  
Biologie und Geographie  
an der  
Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von  
Betina van Fürden

aus Düsseldorf  
April 2009

Die der vorliegenden Arbeit zugrundeliegenden Experimente wurden am Institut für Molekularbiologie der Universität Duisburg-Essen durchgeführt.

**1. Gutachter:** Prof. Dr. E. Winterhager

**2. Gutachter:** Prof. Dr. Dr. H. de Groot

**3. Gutachter:**

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. P. Nalbant

Tag der mündlichen Prüfung: 02.09.2009

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
1.1	Entwicklung der murinen Plazenta	2
1.2	Markergene für die Linienspezifizierung der Trophoblastzelllinie	4
1.2.1	Frühe Trophoblastzelllinie	4
1.2.2	Ektoplazentarkonus und Spongiotrophoblast	5
1.2.3	Trophoblast-Riesenzellen	6
1.2.4	Labyrinth	7
1.3	Stammzelllinien aus der Blastozyste	8
1.3.1	Embryonale Stammzellen (ES-Zellen)	8
1.3.2	Zellen des extraembryonalen Endoderms (XEN-Zellen)	9
1.3.3	Trophoblast- Stammzellen (TS-Zellen)	9
1.4	Gap Junctions	9
1.4.1	Aufbau und Struktur von Gap Junctions	10
1.4.2	Regulation und Funktion der Gap Junctions	11
1.4.3	Rolle der Connexine bei der Plazentaentwicklung der Maus	13
1.4.4	Connexin defiziente Trophoblast-Stammzellen	15
1.4.4.1	<i>Connexin31</i> defiziente TS-Zellen	15
1.4.5	Die <i>Cx31F137L</i> -Punktmutation	15
1.5	Hypoxie	17
1.5.1	Regulierung der HIF-Proteine unter Normoxie und Hypoxie	18
1.6	Zielsetzung	21
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>23</b>
2.1	Material	23
2.1.1	Chemikalien, Verbrauchsmaterial und Enzyme	23
2.1.2	Lösungen und Kulturmedien	25
2.1.3	Kits	25
2.1.4	Antikörper	25
2.1.5	Oligonukleotide	26
2.1.6	Versuchstiere	26

---

<b>2.2</b>	<b>Methoden</b>	<b>27</b>
2.2.1	Zellbiologische Methoden	27
2.2.1.1	Präparation embryonaler Mausfibroblasten	28
2.2.1.2	Herstellung von Fibroblasten-konditioniertem Medium	28
2.2.1.3	Kultivierung von Trophoblast-Stammzellen	28
2.2.1.4	Differenzierungsreihen von TS-Zellen	29
2.2.1.5	Zellproliferationsanalyse	29
2.2.1.6	Zugabe von DMOG	30
2.2.1.7	Morphometrie	30
2.2.2	Proteinbiochemische Methoden	30
2.2.2.1	Kultivierung der TS-Zellen für den Western-Blot	30
2.2.2.2	Protein-Isolierung und Konzentrationsbestimmung	30
2.2.2.3	Western Blot	31
2.2.3	Molekularbiologische Methoden	32
2.2.3.1	Isolierung und Konzentrationsbestimmung von RNA	32
2.2.3.2	Reverse Transkription (RT)	32
2.2.3.3	Semiquantitative PCR	33
2.2.3.4	Agarose-Gelelektrophorese	33
2.2.3.5	Quantitative Real-Time-PCR	34
2.2.3.6	Genotypisierung der <i>Cx31F137L</i> -Mäuse	35
2.2.4	Morphologische Methoden	35
2.2.4.1	Präparation der <i>Cx31+/F137L</i> -Mausplazenta	35
2.2.4.2	Histologische Analyse	36
2.2.4.3	Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung	36
2.2.5	Statistische Auswertung	36
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>37</b>
<b>3.1</b>	<b>Der Einfluss von Hypoxie auf das Differenzierungsverhalten von WT und <i>Cx31</i> defizienten TS- Zellen</b>	<b>37</b>
3.1.1	Wildtyp Trophoblast-Stammzellen	37
3.1.1.1	Proliferationsverhalten der WT TS-Zelllinien unter Hypoxie	37
3.1.1.2	Der Einfluss von Hypoxie auf undifferenzierte TS-Zellen	38
3.1.1.3	Der Einfluss von Hypoxie auf das Differenzierungsverhalten von TS-Zellen	39
3.1.1.3.1	Stammzellmarker <i>Cdx2</i> und <i>Eomes</i>	39
3.1.1.3.2	Labyrinthmarker <i>Gcm1</i> und <i>Cx26</i>	40
3.1.1.3.3	Spongiotrophoblastmarker <i>Mash2</i> , <i>Cx31</i> und <i>Tpbpa</i>	41
3.1.1.3.4	Trophoblast-Riesenzellmarker <i>AP-2<math>\gamma</math></i> und <i>Pl-1</i>	43

---

3.1.1.4	Morphologische Analyse der Trophoblast-Riesenzellen	44
3.1.1.4.1	Auszählung der Trophoblast-Riesenzellen	44
3.1.1.4.2	Ermittlung der Zelloberfläche der Trophoblast-Riesenzellen	44
3.1.1.5	Der Einfluss von Hypoxie auf das Differenzierungsverhalten der TS-Zellen unter verschiedenen Kultivierungsbedingungen	45
3.1.2	<i>Cx31</i> defiziente Trophoblast-Stammzellen	47
3.1.2.1	Proliferationsverhalten der <i>Cx31</i> defizienten Trophoblast-Stammzellen unter Hypoxie	47
3.1.2.2	Der Einfluss von Hypoxie auf das Differenzierungsverhalten von <i>Cx31</i> <sup>-/-</sup> TS-Zellen	48
3.1.2.2.1	Stammzellmarker <i>Cdx2</i> und <i>Eomes</i>	48
3.1.2.2.2	Labyrinthmarker <i>Gcm1</i> und <i>Cx26</i>	49
3.1.2.2.3	Spongiotrophoblastmarker <i>Mash2</i> und <i>Tpbpa</i>	50
3.1.2.2.4	Die Expression des Transkriptionsfaktor <i>AP-2γ</i> in <i>Cx31</i> defizienten TS-Zellen	51
3.1.2.2.5	Die Expression des Trophoblast-Riesenzellmarker <i>Pl-1</i> in <i>Cx31</i> defizienten TS-Zellen	52
3.1.3	Vergleich des Einflusses von Hypoxie auf das Differenzierungsverhalten von WT TS-Zellen und <i>Cx31</i> <sup>-/-</sup> TS-Zellen	53
3.1.4	Rolle von HIF-1α auf das Differenzierungsverhalten von TS-Zellen unter Hypoxie	54
3.1.4.1	Stabilisierung des HIF-1α Proteins in WT TS-Zellen	55
3.1.4.2	Die Behandlung mit DMOG	56
<b>3.2</b>	<b>Die <i>Cx31F137L</i>-Punktmutation</b>	<b>58</b>
3.2.1	Nachweis der Genotypen der untersuchten Mäuse	59
3.2.2	Gewichte der <i>Cx31</i> <sup>+/F137L</sup> Plazenten und Embryonen	60
3.2.3	Histologische Auswertung der <i>Cx31</i> <sup>+/F137L</sup> Plazenten	60
3.2.3.1	Expressionsanalyse von <i>Cx43</i> , <i>Cx31</i> und <i>Cx26</i> in der <i>Cx31F137L</i> - Plazenta	64
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>66</b>
<b>4.1</b>	<b>Der Einfluss von Hypoxie auf das Differenzierungsverhalten von WT und <i>Cx31</i> defizienten TS-Zellen</b>	<b>68</b>
4.1.1	Hypoxie fördert in WT TS-Zellen die Differenzierung in Richtung des Spongiotrophoblasten und der Trophoblast-Riesenzellen	68
4.1.2	Einfluss der HIF-Proteine auf den unter Hypoxie beobachteten Differenzierungsprozess in WT TS-Zellen	73

---

4.1.3	Cx31 KO TS-Zellen zeigen einen Verlust der Hypoxie-bedingten Förderung des Spongiotrophoblasten und der Trophoblast-Riesenzellen	75
4.2	Die Phänotypanalyse der <i>Cx31F137L</i> punktmutierten Plazenta	81
5	ZUSAMMENFASSUNG	85
6	LITERATURVERZEICHNIS	87
7	ANHANG	101
7.1	Abkürzungsverzeichnis	101
7.2	Abbildungsverzeichnis	103
7.3	Tabellenverzeichnis	105
	DANKSAGUNG	106
	LEBENS LAUF	107
	ERKLÄRUNG	108

# 1 Einleitung

Die Plazenta ist das erste embryonale Organ, das während der Schwangerschaft der Säugetiere gebildet wird und essentiell für die intrauterine Entwicklung des Embryos ist. Die Plazenta ist für die Versorgung des Embryos mit Nährstoffen und Sauerstoff sowie für die gleichzeitige Entsorgung von Stoffwechselendprodukten des wachsenden Embryos zuständig. Außerdem synthetisiert sie eine Reihe von Hormonen, wie z.B. die Steroidhormone Progesteron und Östrogen, die zur Aufrechterhaltung der Schwangerschaft notwendig sind (Pepe et al., 1999).

Forschungsergebnisse der letzten Jahre haben gezeigt, dass eine inkorrekte Entwicklung oder die Dysregulation mancher Funktionen der humanen Plazenta verantwortlich für die Entstehung vieler Schwangerschaftserkrankungen (s. Tab. 1.1) sind. Dabei scheint gerade das erste Schwangerschaftstrimenon, das durch Poliferations- und Differenzierungsvorgänge der verschiedenen Zelltypen charakterisiert ist, besonders kritisch für Fehlentwicklungen zu sein (Desoye et al., 2003).

**Tab. 1.1: Schwangerschaftspathologien mit Beteiligung der Plazenta** (Desoye et al., 2003)

- 
- **Präeklampsie**
  - **Intrauterine Wachstumsrestriktion**
  - **Spontanaborte**
  - **Frühgeburtlichkeit**
  - **Makrosomie bei Diabetes**
- 

Eine gestörte Plazentaentwicklung/-funktion kombiniert mit einer Unterversorgung des Foetus kann aber auch postnatal im adulten Alter zu Bluthochdruck und Herzkrankheiten (Barker et al., 1995; Barker et al., 2007) sowie zu metabolischen Krankheiten wie Diabetes führen (Jansson et al., 2007). Aufgrund dieser genannten Gründe fokussiert sich das wissenschaftliche Interesse auf die Grundlagen der Plazentaentwicklung- und funktion.

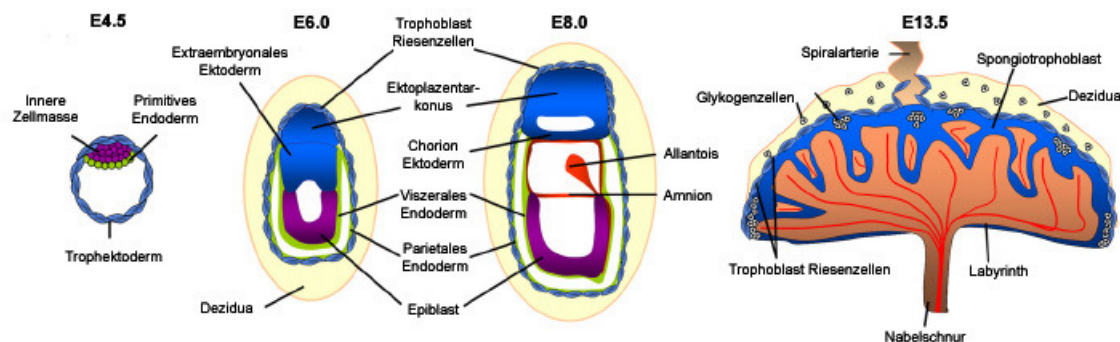
Die Plazenten zeigen eine hohe Variabilität (Cross et al., 1994) zwischen den Spezies und werden nach folgenden Klassifikationskriterien eingeteilt: nach der äußeren Form der Plazenta, der Art der feto-maternalen Invagination, den Grad der Trophoblastinvasion und nach der geometrischen Anordnung des mütterlichen und des kindlichen Blutstromes zueinander (Hinrichsen, 1990).

Die Plazenten von Mensch und Nagetier gehören beide zum Typus der Placenta discoidalis und weisen eine invasive Aktivität des Trophoblasten auf, die zur Erosion der mütterlichen Gefäßwände führt. Somit steht das mütterliche Blut in direkten Kontakt mit der Trophoblastschicht des Embryos (hämo-choriale Plazenta) (Cross et al., 2003). Während bei

den Nagetieren eine labyrinthartige Invagination zu beobachten ist, liegt beim Menschen eine Zottenplazenta vor, wodurch die beiden Plazenten sich in ihrem histologischen Aufbau unterscheiden. Allerdings lässt sich den verschiedenen Plazentenschichten eine starke physiologische Homologie zuordnen (Cross et al., 2000) und auch die molekularen Mechanismen, die der Bildung der Plazenta zugrunde liegen, sind zum Teil vergleichbar. Die Maus kann somit als Modellorganismus für die Plazentation des Menschen eingesetzt werden.

## 1.1 Entwicklung der murinen Plazenta

Die Embryonalentwicklung im engeren Sinne beginnt bei den Säuger an Tag 3.5 pc (post coitum) mit der Bildung der Blastozyste (s. Abb. 1.1). Es werden zwei bestimmte Zelllinien ausgebildet: die innere Zellmasse (inner cell mass, ICM) und das Trophektoderm (TE). Die pluripotenten Zellen der inneren Zellmasse bilden später den Embryo und einige extraembryonale Membranen, wie die Allantois und das Amnion, aus. Die Zellen des Trophektoderms, welches man in das polare und murale Trophektoderm unterteilen kann, sind dagegen der Ursprung der Trophoblastzelllinie, die später den Hauptanteil der Plazenta ausbildet (Gardner und Johnson, 1972).



**Abb. 1.1: Entwicklung der murinen Trophoblastzelllinie.** Schematische Darstellung der Entwicklungsstadien der Mausplazenta von Tag 4.5 bis 13.5 post coitum. Aus dem Trophektoderm der Blastozyste entwickeln sich alle Derivate der Trophoblastzelllinie (modifiziert nach Kibschull et al., 2008).

Zum Zeitpunkt der Implantation an Tag 4.5 pc differenzieren sich die verschiedenen Zelltypen des Trophoblasten aus. Das murale Trophektoderm, das keinen Kontakt zur inneren Zellmasse hat, verliert seine proliferative Aktivität und differenziert zu den primären Riesenzellen, die durch Endoreduplikationen polyploid geworden sind (Barlow et al., 1972). Die Zellen des polaren Trophektoderms, welche der inneren Zellmasse aufliegen, behalten ihren proliferativen, undifferenzierten Zustand bei und bilden den Ektoplazentarkonus und



das extraembryonale Ektoderm aus (Copp, 1978). Im Ekto-plazentarkonus sorgt eine Population von Trophoblast-Stammzellen weiterhin für eine verstärkte Differenzierung in die Trophoblast-Riesenzellen, die nun als sekundäre Trophoblast-Riesenzellen bezeichnet werden. Diese Trophoblast-Riesenzellen sind invasiv und migrieren in das Endometrium, wo sie auf die maternalen Arterien treffen. Hier verdrängen sie die endothelialen Zellen und umranden gänzlich die maternalen Blutgefäße. Durch diesen Prozess werden die sinusoiden Kanäle gebildet, die das maternale Blut zur Implantationsstelle in die sich entwickelnde Plazenta transportieren. Die Trophoblast-Riesenzellen produzieren außerdem noch eine Reihe von parakrinen und endokrinen Faktoren, z.B. angiogenetische Faktoren (Lee et al., 1988; Carney et al., 1993), vasodilatorische Faktoren (Yotsumoto et al., 1998; Gaglioti et al., 2000) und Antikoagulantien (Weiler-Guettler et al., 1996), die ebenfalls den Blutfluss von der Mutter in die Implantationsstelle fördern.

Das extraembryonale Ektoderm dagegen expandiert im weiteren Verlauf der Entwicklung zum Chorionektoderm (7.5 dpc). Gleichzeitig entsteht aus dem Mesoderm am posterioren Ende des Embryos die Allantois. Die Allantois adhäriert zunächst an das Chorion, mit dem sie dann an Tag 8.5 pc fusioniert. Durch diesen Prozess wird die chorion-allantoide Plazenta ausgebildet (Sutherland, 2003; Hemberger, 2007). Das allantoide Mesoderm invadiert anschließend in die Trophoblastzellen des Chorions und bildet dort fetale Endothelzellen aus, die sich zu einem komplexen vaskulären Netzwerk verzweigen. Entlang des einwachsenden Mesenchyms und der Blutgefäße differenziert sich der Choriontrophoblast zum labyrinthären Trophoblasten aus. Der labyrinthäre Trophoblast besteht aus zwei polynukleäre Synzytiotrophoblast-Schichten, die durch Trophoblastfusionen entstehen und die einwachsenden fetoplazentaren Blutgefäße interzellularenfrei überziehen. Die zwei synzytialen Schichten sind mit einer endothelartigen Schicht, die zum maternalen intervillösen Raum grenzt, bedeckt. Dieser komplexe Aufbau gewährleistet einen minimalen Abstand und somit eine kurze Transportstrecke zwischen den maternalen und den fetalen Blutkreislauf (Hemberger, 2007).

An die Labyrinthenschicht schließt sich zur Dezidua hin der Spongiotrophoblast an, welcher aus diploiden Trophoblastzellen und aus glykogenspeichernden Zellen aufgebaut ist. Zur maternalen Dezidua hin differenzieren die Zellen des Spongiotrophoblasten in sekundäre Trophoblast-Riesenzellen, die ebenfalls den Blutfluss zur Implantationsstelle fördern.

Die murine Plazenta nimmt ihre Funktion um den Tag 9.0 pc auf und gewährleistet die ausreichende Ernährung des wachsenden Embryos über die plazentaren Barrieren des Labyrinthes.

## 1.2 Markergene für die Linienspezifizierung der Trophoblastzelllinie

Die Maus ist ein wichtiger Modellorganismus um die komplexen Entwicklungs- und Differenzierungsvorgänge der Plazenta näher zu untersuchen. Mit Hilfe von Knockout Mäusen wurden bereits eine Reihe von Genen identifiziert, die essentiell für eine korrekte Ausbildung der Plazenta sind (Rossant und Cross; 2001). Zudem konnten genetische Signalwege für die Entwicklung der Plazenta aufgestellt werden. Im Folgenden ist eine Übersicht von Genen dargestellt, die wichtige Funktionen bei der Plazentaentwicklung der Maus besitzen.

### 1.2.1 Frühe Trophoblastzelllinie

Der erste erkennbare Differenzierungsschritt in der murinen Entwicklung findet bei der Etablierung des Trophektoderms (TE) und der inneren Zellmasse (ICM) statt, welches man morphologisch im Blastozystenstadium unterscheiden kann (Ralston, 2008). Es konnte gezeigt werden, dass das Caudal-related Homeobox Protein *Cdx2* bei dieser Zelllinien-Segregation eine entscheidende Rolle spielt. Die Expression von *Cdx2* startet ubiquitär im 8-Zellstadium des Embryos, wird dann aber noch vor der Bildung der Blastozyste in den äußeren Zellen - den zukünftigen Trophektodermzellen - hochreguliert (Ralston et al., 2008). Ab dem Blastozystenstadium ist die Expression von *Cdx2* dann charakteristisch für die Zellen des Trophektoderms und anschließend für das extraembryonale Ektoderm. In diesen Zelllinien reprimiert *Cdx2* den pit-Oct-UNC (POU)- domain Transkriptionsfaktor *Oct4* und das Homeodomänen-Protein *Nanog*, die auch in der inneren Zellmasse exprimiert werden und dort für den Erhalt und für die Pluripotenz der ES-Zellen verantwortlich sind (Nichols et al., 1998; Niwa et al., 2000; Chambers et al., 2003). *Cdx2* defiziente Embryonen zeigen somit keine Repression von *Oct4* und *Nanog* in den äußeren Zellen der Blastozyste, was dazu führt, dass das Trophektoderm nicht richtig ausdifferenziert und die Blastozyste nicht richtig implantieren kann (Strumpf et al., 2005). Aus diesem Grunde sterben die *Cdx2* defizienten Embryonen in der Peri-Implantationsphase ab (Chawengsaksophak et al., 1997).

Ein weiterer Faktor, der bei der Determinierung des Trophektoderms im Blastozystenstadium eine Rolle spielt ist *AP-2γ*. *AP-2γ* gehört zu der Familie der AP-2-Transkriptionsfaktoren und erscheint in der murinen Entwicklung erstmals mit Beginn der Trophoblastzelldifferenzierung und bleibt bei fortschreitender Plazentaentwicklung in allen Zellen der Trophoblastlinie bestehen (Shi and Kellems, 1998). *AP-2γ* defiziente Embryonen zeigen unterentwickelte extraembryonale Gewebe und sterben bereits an Tag 6.5 pc direkt nach der Implantation *in utero* ab. Dies beruht auf einer verminderten Proliferation der Trophoblastzellen, die zu einer Reduktion der Plazentaanlage, dem Ekto-plazentarkonus führt. Außerdem ist die Anzahl der Trophoblast-Riesenzellen stark vermindert und das Labyrinth nicht richtig ausgebildet (Auman et al., 2002). Buhl et al. (2009) konnten zeigen, dass *AP-2γ* für die Generierung von

TS-Zellen essentiell ist. So konnten aus *AP-2 $\gamma$*  defizienten Blastozysten keine TS-Zellen etabliert werden, während eine Überexpression von *AP-2 $\gamma$*  in ES Zellen dazu führte, dass die Zellen zu TS-Zellen ausdifferenzierten. Es konnte hierbei gezeigt werden, dass *AP-2 $\gamma$*  von *Cdx2* aktiviert wird und das *AP-2 $\gamma$*  durch Repression von *Nanog* die Determinierung mit beeinflusst (Buhl et al., 2009).

Das T-Box-Gen *Eomesodermin* (*Eomes*) ist ein weiterer Transkriptionsfaktor, der für die Ausbildung des Trophektoderms essentiell ist. Die Expression vom *Eomes*-Protein kann bereits in der Oozyte detektiert werden und bleibt anschließend bis zur Bildung der frühen Blastozyste in allen Zellkernen bestehen (McConell et al., 2005). *Eomes* defiziente Embryonen bilden zwar noch Blastozysten aus, zeigen aber Defekte bei der weiteren Proliferation und Differenzierung des Trophektoderms, was zum Tod der Embryonen in der Peri-Implantationsphase führt (Russ et al., 2000; Strumpf et al., 2005). Da in den *Eomes* defizienten Embryonen eine *Cdx2*- Expression beobachtet werden konnte, ist *Eomes* in der Signalkaskade der Transkriptionsfaktoren zur Determinierung des Trophektoderms wohl *downstream* von *Cdx2* lokalisiert (Strumpf et al., 2005).

### 1.2.2 Ektoplazentarkonus und Spongiotrophoblast

Die Zellen des Ektoplazentarkonus liegen in den frühen Postimplantationsphasen zwischen der Chorionschicht und den Trophoblast-Riesenzellen, die zur maternalen Dezidua lokalisiert sind. Aufgrund des Genexpressionsmusters wird angenommen, dass die Zellen des Ektoplazentarkonus später zu den Zellen des Spongiotrophoblasten werden (Cross et al., 2003). So konnte z.B. eine frühe Expression vom Trophoblast-specific-protein alpha (*Tpbpa*) und vom VEGF-Rezeptor *Flt1*, die später spezifisch für den Spongiotrophoblasten sind, an der apikalen Seite des Ektoplazentarkonus beobachtet werden (Lescisin et al., 1988; He et al., 1999).

Essentiell für die Ausbildung und die Proliferation der Zellen des Ektoplazentarkonus ist der Transkriptionsfaktor *Ets2*. Eine schwache Expression von *Ets2* kann bereits im Trophektoderm der Blastozyste beobachtet werden, die anschließend im Ektoplazentarkonus stark ansteigt. *Ets2* defiziente Mäuse sterben vor dem Tag 8.5 pc ab und weisen eine Unterlassung der Zellproliferation im Ektoplazentarkonus auf (Yamamoto et al., 1998).

Ein weiterer charakteristischer Marker für den Ektoplazentarkonus ist der *basic helix-loop-helix* Transkriptionsfaktor *Mash2* (*achaete-scute complex homolog-like 2*). *Mash2* wird im Chorion, im Ektoplazentarkonus und später im Spongiotrophoblasten expremiert (Guillemot et al., 1994; Nakayama et al., 1997). *Mash2* defiziente Embryonen weisen einen normalen Ektoplazentarkonus und ein normales Chorionektoderm auf (Cross et al., 2003). Im weiteren Verlauf der Entwicklung kann jedoch ein reduzierter Spongiotrophoblast beobachtet werden, der mit einer verstärkten Differenzierung in Richtung der Trophoblast-Riesenzellen

einhergeht (Guillemot et al., 1994; Tanaka et al., 1997). Hughes et al. (2003) konnten zeigen, dass *Mash2* die Proliferation der Zellen des Ektoplazentarkonus fördert, während es die weitere Ausdifferenzierung dieser Zellen in Richtung der Trophoblast-Riesenzellen inhibiert.

### 1.2.3 Trophoblast-Riesenzellen

Trophoblast-Riesenzellen (TGC) kann man in die primären Trophoblast-Riesenzellen und in die sekundären Trophoblast-Riesenzellen einteilen. Die primären Trophoblast-Riesenzellen bilden sich sofort nach der Implantation aus dem muralen Trophektoderm und die sekundären Riesenzellen differenzieren sich aus den Zellen des Ektoplazentarkonus und des Spongiotrophoblasten (Cross et al., 1994; Hemberger und Cross, 2001; Rossant und Cross, 2001). Sie sind invasiv, modulieren das maternale Gefäßsystem der Dezidua und produzieren verschiedene plazentaspezifische Hormone, wie z.B. Placental lactogen 1 und 2 (PI-1, PI-2). Diese Hormone, die charakteristisch für die TGCs sind, stimulieren die luteale Progesteronproduktion, die essentiell für den Erhalt der Schwangerschaft ist (Talamantes und Ogren, 1988). Trophoblast-Riesenzellen bilden keine homogene Population. Neben den TGCs, die an der Grenze der Implantationsstelle lokalisiert sind, konnten weitere TGC Subtypen identifiziert werden, die sich anhand der Morphologie und ihres Expressionsmusters unterscheiden lassen (Simmons et al., 2007) : die Spiralarterien-assoziierten TGCs (Adamson et al., 2002; Cross et al., 2002; Hemberger et al., 2004), die maternalen Blutkanal-assoziierten TGCs und die TGCs, die innerhalb der sinusoidalen Räume des Labyrinthes lokalisiert sind (Simmons et al., 2007).

Für die Differenzierung der Trophoblast-Riesenzellen ist der *basic-helix-loop-helix* Transkriptionsfaktor *Hand1* notwendig, der ein Antagonist von *Mash2* ist. Während die Expression von *Hand1* die Entwicklung der Trophoblast-Riesenzellen fördert (Riley et al., 1998) inhibiert die ektopische Expression von *Mash2* diesen Prozess (Kraut et al., 1998; Scott et al., 2000). *Hand1* defiziente Embryonen zeigen somit weiterhin eine starke *Mash2*-Expression (Riley et al., 1998), was zu einer Inhibition der TGC-Bildung führt (Scott et al., 2000). Aus diesem Grunde sind *Hand1* defiziente Embryonen weniger invasiv (Hemberger et al., 2004) und sterben zwischen den Tagen E7.5 und E8.5 ab (Scott et al., 2000).

Da auch *AP-2γ* defiziente Embryonen weniger invasiv sind und eine reduzierte Anzahl von TGCs aufweisen (Auman et al., 2002; Werling et al., 2002), wird auch für *Ap-2γ* eine Rolle bei der Ausbildung der TGCs vermutet. So konnte Öztürk et al (2006) *AP-2γ* als Enhancer für die Placental lactogen II - Expression in den TGCs der Rcho-Zelllinie identifizieren.

### 1.2.4 Labyrinth

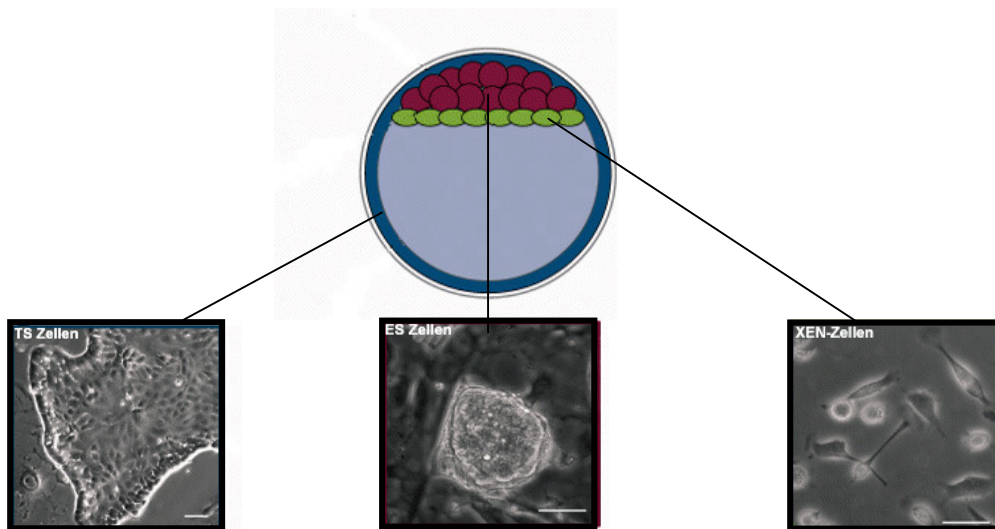
Die Bildung des Labyrinthes beginnt am Tag E8.5, wenn das Mesoderm der Allantois an die basale Oberfläche der Chorionschicht adhäriert und fusioniert (Cross et al., 2000). Aufgrund dieser Fusion beginnen sich die Zellen der Chorionschicht zu differenzieren und bilden entlang des einwachsenden Mesenchyms durch Zellfusionen den polynukleären Synzytiotrophoblasten. Das *glial cells missing 1* (Gcm1) - Protein charakterisiert die Stellen in der Chorionplatte, an denen die Einfaltung des Trophoblasten und die Einsprossung des allantoiden Mesoderms stattfindet und später die Zellen, die zum Synzytiotrophoblasten fusionieren (Anson-Cartwright et al., 2000). *Gcm1* defiziente Embryonen zeigen eine Blockierung der chorioallantoiden Verzweigung und einen undifferenzierten labyrinthären Trophoblasten, was am Tag 10 pc zum Absterben der Embryonen führt (Anson-Cartwright et al., 2000).

Es konnte noch eine Reihe von weiteren Faktoren identifiziert werden, die für die Entwicklung der Labyrinthschicht wichtig sind, wie z.B. *Dlx3* (Morasso et al., 1999) und *Esx1* (Li und Behringer, 1998), deren Regulation und zelluläre Funktion noch nicht bekannt ist. Der Wnt- aktivierte Transkriptionsfaktor Wnt7b (Parr et al., 2001), spielt eine wichtige Rolle bei der chorioallantoiden Fusion, ebenso wie eine Reihe von verschiedenen Wachstumsfaktoren-Rezeptoren, wie z.B. *Fgfr2* (fibroblast growth factor receptor), *Lifr* (leukemia inhibitory factor receptor) oder *c-MET* (kodiert für den HGF-Rezeptor) (Bladt et al., 1995; Xu et al., 1998).

### 1.3 Stammzelllinien aus der Blastozyste

Um die komplexen Entwicklungs- und Differenzierungsvorgänge und die darin involvierten genetischen Signalwege während der Embryonalentwicklung der Maus näher zu untersuchen, wurden Stammzellen aus der Blastozyste der Maus etabliert.

Von der Blastozyste der Maus können drei verschiedene Stammzellen etabliert werden. Die embryonalen Stammzellen (ES-Zellen), die Zellen des extraembryonalen Endoderms (XEN-Zellen) und die Trophoblast-Stammzellen (TS-Zellen) (s. Abb. 1.2).



**Abb. 1.2: Stammzelllinien aus der Blastozyste.** Blau: Aus dem Trophektoderm der Blastozyste werden die Trophoblast Stammzellen (TS-Zellen) gewonnen. Rot: Aus der inneren Zellmasse der Blastozyste werden Embryonale Stammzellen (ES-Zellen) etabliert. Grün: Aus dem primitiven Endoderm der Blastozyste werden die Zellen des extraembryonalen Endoderms (XEN-Zellen) generiert (modifiziert nach Ralston et al., 2005).

#### 1.3.1 Embryonale Stammzellen (ES-Zellen)

Die embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) werden aus der inneren Zellmasse der Blastozyste gewonnen und sind in der Lage in alle drei Keimblätter (Entoderm, Ektoderm und Mesoderm) sowie in die Zellen der Keimbahn auszudifferenzieren. Die Kultivierung der ES Zellen findet in Standardzellkulturmedium, welches mit dem Leukemia inhibitor factor (LIF) versetzt worden ist, statt. Sie bilden hierbei flache runde Kolonien aus (s. Abb. 1.2). Oftmals werden sie auch auf einer Schicht von murinen embryonalen Fibroblastzellen, die auch als „Feeder“-Zellen bezeichnet werden, kultiviert. Die Differenzierung der ES-Zellen in die Zellen aller drei Keimblätter sowie in die Keimbahnzellen wird durch den Entzug von LIF induziert (Ralston et al., 2005). Unter bestimmten Kulturbedingungen können sie auch in die Zellen des Trophektoderms oder in die Zellen des primitiven Endoderms differenzieren (Niwa et al., 2005; Niwa et al., 2007).

### 1.3.2 Zellen des extraembryonalen Endoderms (XEN-Zellen)

Die Zellen des extraembryonalen Endoderms (XEN) werden aus dem primitiven Endoderm der Blastozyste gewonnen. XEN-Zellen werden in der Anwesenheit von fetalem bovinem Serum und von Fibroblasten-konditioniertem Medium auf Gelatine kultiviert, wo sie zwei verschiedene Morphologien aufweisen: einen rundlichen Zelltyp und einen epithelialen sternförmigen Zelltyp (Kunath et al., 2005) (s. Abb. 1.2). Wenn XEN-Zellen in Blastozysten injiziert werden, sind sie in den ausgebildeten Chimären vornehmlich in den Zellen des extraembryonalen Endoderms lokalisiert (Kunath et al., 2005).

### 1.3.3 Trophoblast- Stammzellen (TS-Zellen)

Trophoblast Stammzellen (TS-Zellen) können aus den Zellen des Trophektoderms der 3.5 dpc Blastozyste oder aus den Zellen des extraembryonalen Ektoderm von 6.5 dpc Embryonen gewonnen werden (Tanaka et al., 1998). Zur Generierung und Kultivierung der TS-Zellen ist FGF4, welches zu der Familie der Fibroblasten-Wachstumsfaktoren gehört, notwendig. FGF4 wird in der inneren Zellmasse der Blastozyste gebildet, während der Rezeptor (FGFR2) im Trophektoderm sowie im extraembryonalen Ektoderm und im Chorion lokalisiert ist (Rossant und Cross, 2001). FGF4, Heparin und von Fibroblasten, die einen noch nicht identifizierten Faktor produzieren, konditioniertes Medium ist notwendig, um das Stammzellpotential der Zellen zu erhalten (Tanaka et al., 1998). Es konnte jedoch gezeigt werden, dass Mitglieder der TGF- $\beta$ -Familie (Activin und Nodal) in der Lage sind das konditionierte Medium für die Erhaltung des Stammzellpotentials der TS-Zellen zu ersetzen (Ma et al., 2001; Erlebacher et al., 2004; Guzman-Ayala et al., 2004). Durch den Entzug von FGF4, Heparin und konditioniertem Medium wird die Differenzierung der TS-Zellen induziert, wobei sie Trophoblastderivate des Synzytiotrophoblasten, des Spongiotrophoblasten und der Trophoblast-Riesenzellen ausbilden können (Hemberger et al., 2004). *In vivo* bilden die TS-Zellen in Chimären ebenfalls alle Zellen der Trophoblastzelllinie, aber keine Derivate des Embryos aus (Tanaka et al., 1998).

## 1.4 Gap Junctions

Die interzelluläre Kommunikation zwischen den Trophoblastzellen mittels Gap Junction Kanäle ist essentiell für die korrekte Entwicklung und Physiologie der Plazenta. Gap Junctions sind i.A. verantwortlich für die Regulierung von Differenzierungsprozessen während der Organogenese, wie auch für die Homöostase und die Integrität eines Gewebes (Winterhager et al., 2005).

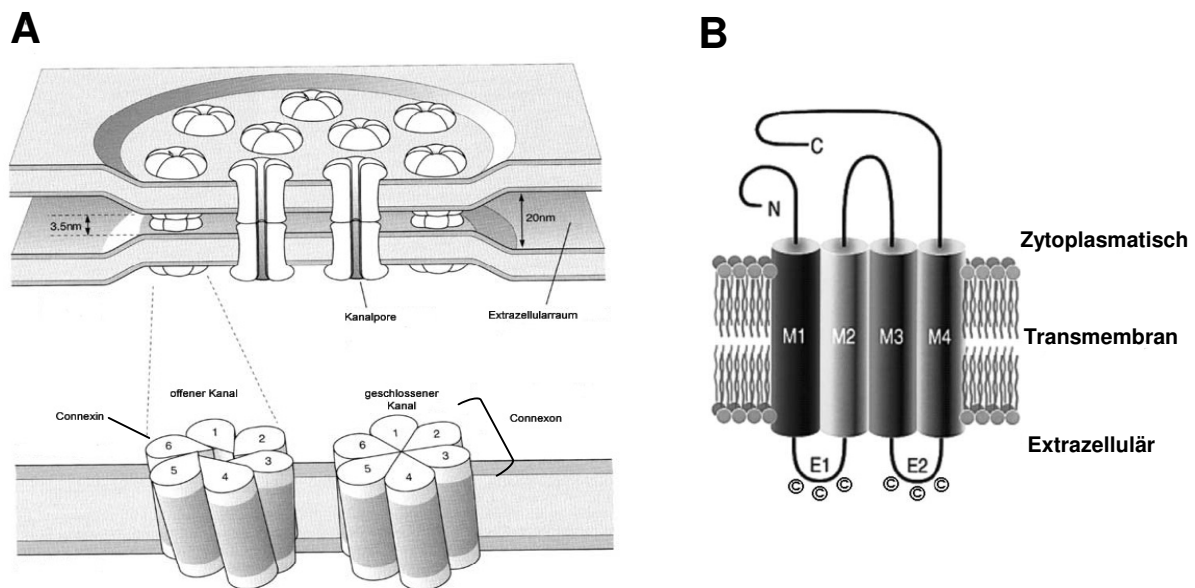
### 1.4.1 Aufbau und Struktur von Gap Junctions

Gap Junctions sind kanalbildende Proteinkomplexe, die die zytoplasmatischen Kompartimente zweier benachbarter Zellen miteinander verbinden. Ein Gap Junction Kanal wird dabei aus zwei Halbkanälen (Hemichannels, Connexone) gebildet, wobei jede Zelle einen Halbkanal beisteuert (s. Abb. 1.3 A). Je nachdem ob der Kanal aus zwei gleichen oder zwei verschiedenartigen Halbkanälen aufgebaut wird, spricht man vom homo- bzw. heterotypischen Kanal (Goodenough et al., 1976). Jedes Connexon ist wiederum aus sechs Connexinen aufgebaut. Ein homomeres Connexon wird nur aus einer Sorte Connexin-Proteinen aufgebaut, während ein heteromeres Connexon von verschiedenartigen Connexinen aufgebaut wird (Jiang und Goodenough, 1996). Im Inneren der Connexone befindet sich eine hydrophile Pore, die den Austausch von Ionen ( $K^+$  und  $Ca^{2+}$ ), sekundären Botenstoffen (cAMP, cGMP,  $IP_3$ ) und Metaboliten (Glucose, Aminosäuren) bis zu einem Molekulargewicht von 1 kD ermöglichen (Kanno et al., 1964; Simpson et al., 1977; Lawrence et al., 1978).

Die Connexine besitzen alle einen sehr ähnlichen Aufbau. Jedes Connexin setzt sich aus vier  $\alpha$ -helikalen Transmembranregionen, zwei extrazellulären Schleifen, sowie drei im Zytoplasma liegenden Proteindomänen (Aminoterminal, zytoplasmatische Schleife, Carboxyterminal) zusammen (s. Abb. 1.3 B). Der Aufbau der Transmembranregionen, der beiden extrazellulären Schleifen, sowie der Aminoterminal ist in den Connexinen stark konserviert. Die zytoplasmatische Schleife und der C-Terminus variieren aber stark in der Länge und der Aminosäuresequenz, woraus sich die unterschiedlichen Größen der Connexine ergeben. So variiert ihre Größe zwischen 23 kDa und 63 kDa.

Derzeit sind 20 Connexine im Genom der Maus und 21 Connexine im Genom des Menschen identifiziert worden (Söhl et al., 2003; Söhl et al., 2004). Für die Nomenklatur der Connexine existieren zwei unterschiedliche Systeme. Nach der älteren Nomenklatur setzt sich der Name aus der Abkürzung Cx (Connexin) und der theoretischen Molekularen Masse zusammen (z.B. repräsentiert Cx26 das Connexinprotein mit einer Masse von 26 kDa) (Beyer et al., 1987). In der neueren Nomenklatur werden die Connexine anhand ihrer Sequenzhomologien in der Aminosäureabfolge der zytoplasmatischen Schleife in verschiedenen Gruppen eingeteilt: In GJ (Gap junction membrane channel protein) alpha, beta und gamma. Zusätzlich werden sie nach der zeitlichen Abfolge ihrer Entdeckung entsprechend nummeriert (Söhl et al., 2003). In dieser Arbeit wird die Nomenklatur nach Beyer et al. (1987) verwendet.





**Abb. 1.3: Aufbau von Gap Junctions und Connexinen.** **A.** Gap Junctions liegen meist in Gruppen zusammen und verbinden die zyttoplasmatischen Kompartimente zweier benachbarter Zellen. Sie sind aus zwei Halbkanälen, den Connexonen aufgebaut, die sich aus 6 Connexinen zusammensetzen. **B.** Ein Connexin ist immer aus vier  $\alpha$ -helikalen Transmembranregionen, zwei extrazellulären Schleifen, sowie einen zyttoplasmatischen C- und N-Terminus und einer zyttoplasmatischen Schleife aufgebaut. E: Extrazellulärschleife; M: Transmembrandomäne; C: C-Terminus; N: N-Terminus (modifiziert nach Söhl und Willecke, 2004)

### 1.4.2 Regulation und Funktion der Gap Junctions

Die Synthese der Connexine findet im rauen endoplasmatischen Retikulum statt (rER), wo sie anschließend posttranslational modifiziert, in die rER - Membran inseriert und gefaltet werden. Die Oligomerisierung zu den Hexameren erfolgt im trans-Golgi-Apparat, durch den die Hemikanäle auch zur Plasmamembran transportiert werden (Leithe und Rivedal, 2007). Die fertigen Hemikanäle werden dann in die Plasmamembran eingebaut, wo sie anschließend auf einen Hemikanal der Nachbarzellen treffen und so einen funktionsfähigen Gap-Junction-Kanal ausbilden.

Die Leitfähigkeit der Gap-Junction-Kanäle kann durch eine Vielzahl von Faktoren reguliert werden. Eine Regulation erfolgt z.B. durch Phosphorylierungsprozesse am C-Terminus via Proteinkinasen. Zu diesen Kinasen gehören z.B. die MAP-Kinasen (mitogen-activated protein), die Proteinkinase A (PKA), die Proteinkinase C (PKC) und die c-Src Kinase (Moreno et al., 2007). Diese Modifikationen können die Zusammensetzung der Connexone, deren Öffnungszustand und Halbwertszeit je nach Connexin und Zelltyp unterschiedlich beeinflussen (Benett et al., 1991).

Der Verschluss oder die Öffnung eines Gap-Junction-Kanals kann auch durch Veränderungen der Spannungsdifferenzen (Brink, 2000) oder durch die Senkung des intrazellulären pH-Wertes beeinflusst werden (Wang et al., 1996; Francis et al., 1999).

Eine weitere Regulation der Leitfähigkeit findet mit Hilfe von proteasomalen und ubiquitinabhängigen Abbauwegen über die Lebensdauer der Gap-Junction-Proteine statt (Leithe und Rivedal, 2007). Die Halbwertszeit der Connexin-Proteine liegt im Allgemeinen bei ca. 5h und erlaubt somit dynamische regulatorische Eingriffe (Herve et al., 2007).

Gap Junctions weisen nicht nur Kanalfunktionen für den Austausch von Molekülen auf, sie wirken auch durch direkte Protein-Protein-Interaktionen mit intrazellulären Proteinen. So weist der C-Terminus Bindungsmöglichkeiten für eine Anzahl von zytoplasmatischen Proteinen auf und wirkt somit auf einige intrazelluläre Signalkaskaden. Zu diesen Proteinen gehört z.B. das Zonula occludens 1 (ZO-1) Protein, sowie einige Wachstumsfaktoren, wie z.B. das CCN3 (NOV), welche mit dem C-Terminus des Cx43 interagieren (Giepmans, 2004; Gellhaus et al., 2004; Fu et al., 2004).

Anhand von Connexin defizienten Mäusen konnte den einzelnen Connexinen in vivo eine Reihe von essentiellen Funktionen in den verschiedenen Geweben zugeordnet werden (s. Tab. 1.2).

Außerdem sind eine Reihe von Connexin Mutationen im humanen Genom bekannt, welche teilweise zu schwerwiegenden Erkrankungen führen. So konnten z.B. kardiale Missbildungen bei der viszeroatrialen Heterotaxie auf Mutationen im C-Terminus des Cx43 zurückgeführt werden (Britz-Cunningham et al., 1995). Das X-chromosomal vererbte Charcot-Marie-Tooth-Syndrom (CMTX), welches durch Muskelatrophie aufgrund der Degeneration von peripheren Nerven charakterisiert ist, wird durch Mutationen im Cx32 Gen verursacht (Paul et al., 1995). Die homozygote Inaktivierung von Cx46 bzw. Cx50 führt auf der Linse, die über zahlreiche Gap-Junctions verfügt, zu Bildung von Katarakten (Gong et al., 1999; White et al., 1998, Goodenough et al., 1980).

Das Keratitis-Ichthyosis Taubheitssyndrom (KID) ist auf Mutationen im Cx26 Gen zurückzuführen (van Steensel, 2004), während Mutationen im Cx30 das Clouston Syndrom, dessen Symptome Nageldysplasie und Alopezie mit einer häufig auftretenden palmo-plantaren Hyperkeratose sind, verursachen (van Steensel, 2004).

**Tab. 1.2: Zusammenfassung der bisher bekannten Funktionen von Connexine in der Maus.** Angegeben sind die Hauptexpressionsorte der jeweiligen Connexine und die Phänotypen der entsprechenden Knockout Mäuse (modifiziert nach Willecke et al., 2002). n.a.: nicht analysiert

Connexin	Haupt-Expressionsort	Phänotyp der Cx-defizienten Maus
Cx23	n.a.	n.a.
Cx26	Brust, Haut, Cochlea, Leber, Plazenta	Letaler Plazentadefekt, Hörverlust
Cx29	Schwann-Zellen, Oligodendrozyten	n.a.
Cx30	Haut, Hirn, Cochlea, Niere	Hörverlust
Cx30.2	Herz	n.a.
Cx30.3	Haut	n.a.
Cx31	Haut, Cochlea, Plazenta, Uterus	Plazentare Dysmorphogenese
Cx31.1	Haut, Plazenta	Plazentadefekte
Cx32	Leber, Schwann Zellen	Verminderter Glykogenabbau, erhöhte Leberkarzinogenese
Cx33	Testis	n.a.
Cx36	Neurone in Retina und Gehirn	Visuelle Defizite
Cx37	Blutgefäße, Oozyte	Weibliche Sterilität
Cx39	Embryonale Muskulatur	n.a.
Cx40	Herz, Lunge, Blutgefäße	Atriale Arrhythmie
Cx43	Fast ubiquitär	Fehlbildungen am Herzen
Cx45	Herz, Blutgefäße, Neurone im Gehirn	Embryonale Lethalität an ED10.5
Cx46	Linse, Herz	Zonularer nukleärer Katarakt
Cx47	Oligodendrozyten	Deformierung des Myelins
Cx50	Linse	Mikrophthalmie, zonularer und pulverulenter Katarakt
Cx57	Retina, Ovar	n.a.

### 1.4.3 Rolle der Connexine bei der Plazentaentwicklung der Maus

Während der Embryonalentwicklung der Säuger kann bereits im 2-4 Zellstadium eine Reihe von Connexin Transkripten (*Cx30*, *Cx31*, *Cx36*, *Cx43*, *Cx57*) nachgewiesen werden (Davies et al., 1996; Valdimarsson et al., 1995; Houghton et al., 2002), wobei *Cx43* das vorherrschende Connexin ist (DeSousa et al., 1993). Im Blastozystenstadium findet man sowohl im Trophektoderm, als auch in der inneren Zellmasse, eine starke Expression von *Cx31* und *Cx43* (DeSousa et al., 1993; Houghton et al., 2002). Interessanterweise zeigen die *Cx43* und *Cx31* defiziente Mäuse jedoch eine normale Präimplantationsentwicklung und eine normale Implantation (Kidder et al., 2001; Söhl et al., 2004). Nach der Implantation am Tag 4.5 pc findet eine strenge Segregation der Connexine statt. Während die Expression von *Cx43* nur noch im Epiblasten nachweisbar ist, kann die *Cx31* Expression nur noch im Trophektoderm - dem Ursprung der Trophoblastzelllinie - detektiert werden. Diese strenge

Segregation der Gap Junction Proteine führt zu zwei geschlossenen Kommunikationskompartimenten - den Embryo und die Trophoblastzelllinie- welches auch anhand des Farbstoffes Lucifer Yellow, der frei durch die Gap Junctions diffundieren kann, gezeigt werden konnte (Lo et al., 1979; Kalimi et al., 1989).

Von diesem Stadium an charakterisieren nun *Cx31* und *Cx31.1*, dessen Expression nach der Implantation ebenfalls in den Trophoblastzellen induziert wird, die extraembryonale Zelllinie (Dahl et al., 1996; Reuss et al., 1996; Zheng-Fischöfer et al., 2007). So kann im Ektoplazentarkonus, im extraembryonalen Ektoderm als auch im Chorionektoderm eine starke *Cx31* und *Cx31.1* Expression beobachtet werden. Auch im Spongiotrophoblasten und in den Glykogenzellen wird bis zum Ende der Schwangerschaft *Cx31* exprimiert, wogegen *Cx31.1* ab Tag E10.5 jedoch in den Zellen des Spongiotrophoblasten reprimiert wird und dann nur noch in den Glykogenzellen zu finden ist (Zheng-Fischöfer et al., 2007).

Es konnten für beide Connexine entsprechende Knockout Mäuse generiert werden. Die *Cx31* defizienten Mäuse zeigen eine starke Dymorphogenese der Plazenta mit einem reduzierten Spongiotrophoblasten, einem rudimentären Labyrinth und einer stark erhöhten Anzahl von Trophoblast-Riesenzellen (Plum et al., 2001). Diese Dymorphogenese der Plazenta führt zum Tod von 60% der Embryonen zwischen den Tagen E10.5 und E13.5.

Der Verlust des *Cx31.1* Gens führt zum Tod von 30 % der Embryonen zwischen den Tagen E11.5 und E14.5. Die Plazenten der *Cx31.1* defizienten Mäuse zeigen eine kompaktere Struktur des Spongiotrophoblasten und ein fehlentwickeltes Labyrinth. Das Labyrinth besitzt einen sehr dichten Aufbau und die Zwischenräume, die mit maternalem Blut gefüllt sind, sind in ihrer Größe reduziert (Zheng-Fischöfer et al., 2007).

*Cx26* ist in der Synzytiotrophoblastschicht des Labyrinthes zu finden, wo es die beiden Schichten des Synzytiotrophoblasten miteinander verbindet und hier u.a. für den fetomaternalen Glukosetransport verantwortlich ist. *Cx26* defiziente Embryonen sterben aufgrund eines 60%-igen reduzierten Glukosetransportes an Tag E9.5. *Cx26* besitzt somit eine metabolische Funktion und ist nicht in der Regulation der Trophoblastdifferenzierung involviert (Gabriel et al., 1998).

Die Rolle die *Cx43*, das ab Tag E10.5 im Spongiotrophoblasten induziert wird, bei der Plazentaentwicklung spielt, ist noch unklar. *Cx43* homozygot defiziente Mäuse weisen zwar eine Fehlbildung des Herzens auf, die während oder in den ersten Stunden nach der Geburt zum Absterben der Embryonen führt, jedoch sind hier keine Plazentadefekte beobachtet worden (Reaume et al., 1995). Generierte *Cx31/Cx43* Doppel Knockout Mäuse zeigen auch nur den Phänotyp der *Cx31* bzw. der *Cx43* defizienten Mäuse, aber keine zusätzlichen Effekte (Kibschull et al., 2005).

*Cx45* wird im extraembryonalen Mesoderm der Allantois exprimiert. Die *Cx45* defizienten Mäuse sterben zwischen den Tagen E9.5 und E10.5 aufgrund von Störungen in der

vaskulären Entwicklung ab. Es bilden sich hier keine geschlossenen Gefäße im Dottersack aus. Zusätzlich zeigen *Cx45* defiziente Mäusen zwar eine Fusion des Mesoderms mit dem Chorion, jedoch weisen sie eine reduzierte Invasion der Mesenchymzellen in die Plazenta auf, was zu Defekten bei der Ausbildung der Plazentagefäße führt (Krüger et al., 2000).

#### 1.4.4 Connexin defiziente Trophoblast-Stammzellen

Da Trophoblast-Stammzellen während der Differenzierung entlang der Trophoblastzelllinie das koordinierte Connexin-Expressionsmuster der Plazenta aufweisen, stellen sie ein geeignetes Modell dar, um die Funktion von Connexinen während der Trophoblast-Differenzierung genauer zu analysieren.

So wurden aus den Blastozysten von *Cx26*, *Cx31* und *Cx43* defizienten Mäusen TS-Zellen etabliert und diese genauer auf ihr Differenzierungs- und Proliferationsverhalten im Vergleich zum Wildtyp untersucht (Kibschull et al., 2004).

Während die *Cx26* und die *Cx43* defizienten TS-Zellen bezüglich ihres Differenzierungs- und Proliferationsverhaltens keine wesentlichen Unterschiede zu den Wildtyp TS-Zellen zeigten, weisen die *Cx31* defizienten TS-Zellen eine fehlregulierte Differenzierung auf (Kibschull et al., 2004).

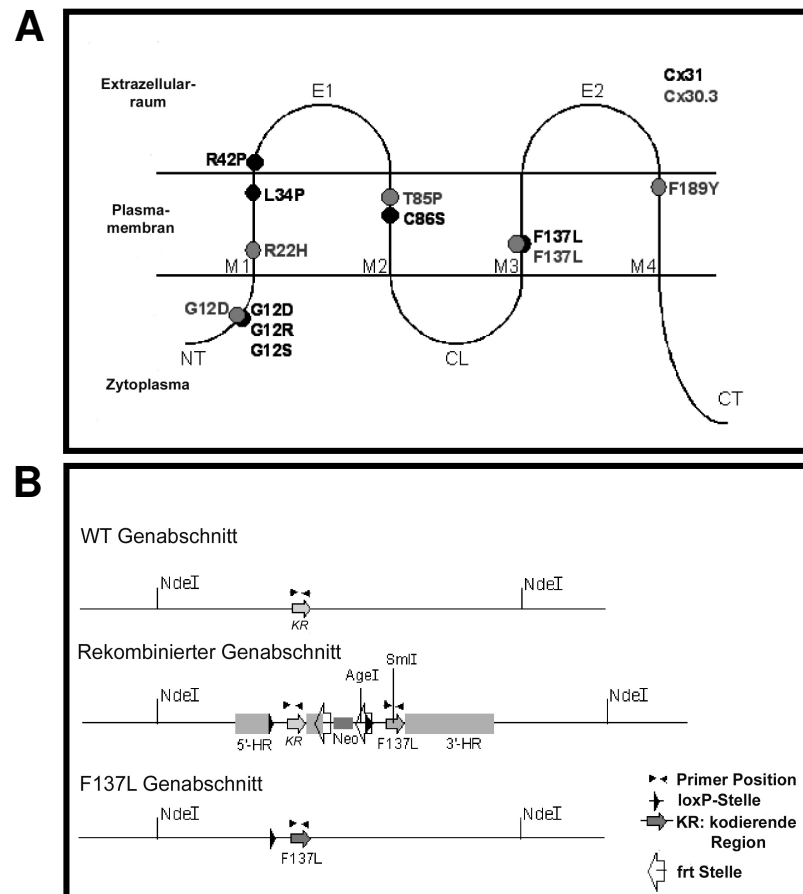
##### 1.4.4.1 Connexin31 defiziente TS-Zellen

Von Kibschull et al. (2004) generierte *Cx31*<sup>-/-</sup> TS-Zellen wurden auf ihr Proliferations- und Differenzierungsverhalten hin analysiert. Dazu wurde die Expression von den spezifischen Differenzierungsmarkern *Mash2*, *Tpbpa*, *Pl-1* und *Cx26* untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass *Mash2* im Vergleich zum Wildtyp (WT) zwei Tage früher induziert wurde und nach dem 3. Tag der Differenzierung eine schnellere Runterregulierung aufwies. Auch die Expression von *Tpbpa*, *Pl-1* und *Cx26* zeigten eine um zwei Tage frühere Induktion auf. Außerdem konnte während des Differenzierungsprozesses in den *Cx31* defizienten TS-Zellen eine reduzierte Proliferation beobachtet werden (Kibschull et al., 2004). Aus diesen Ergebnissen resultiert, dass *Cx31* essentiell für die Aufrechterhaltung des Stammzellcharakters und für die Proliferationskapazität der TS-Zellen ist und der Verlust des *Cx31* Kanals zu einer verstärkten Differenzierung führt (Kibschull et al., 2004). Dieses gestörte Gleichgewicht zwischen Proliferation und Differenzierung ist wohl auch die Ursache für den von Plum et al. (2001) beobachteten Phänotyp der *Cx31* defizienten Plazenten.

#### 1.4.5 Die *Cx31F137L*-Punktmutation

Die Bedeutung des *Cx31*-Kanals für die Plazentaentwicklung konnte auch anhand der von Schnichels et al. (2007) generierten konditionalen Mausmutanten gezeigt werden, die im *Cx31* Gen eine F137L Punktmutation aufweisen. Diese transgenen Mäuse wurden als Modell für die humane Hautkrankheit *Erythrokeratoderma variabilis* (EKV) generiert. EKV ist

eine autosomale dominante Genodermatose, die beim Menschen meist in früher Kindheit beginnt und von stationären Hyperkeratosen und wandernden Erythemen gekennzeichnet ist. 50% der Patienten weisen auch palmoplantare Hyperkeratosen auf (Richard et al., 2000; Durani et al., 2008). Dieses Krankheitsbild ist vornehmlich auf Mutationen im *Cx31* Gen und auf Mutationen im *Cx30.3* Gen zurückzuführen. Dabei wird angenommen, dass sie einen negativen Effekt auf die koexprimierenden Wildtyp Connexine und vermutlich auch einen transdominanten negativen Effekt auf die anderen Connexinproteine ausüben (Richard et al., 1998). Die Mutationen befinden sich hauptsächlich im zytoplasmatischen Amino-Terminus (G12D, G12R) oder in den membrandurchspannenden  $\alpha$ -Helizes des *Cx31*- (R42P, C86S, F137L) oder des *Cx30.3* -Gens (R22H, T85P, F137L, F189L) (Wilgoss et al., 1999; Macari et al., 2000; Richard et al., 1998, 2000, 2003). Die Positionen 12 und 137 sind dabei in beiden Connexinen von Mutationen betroffen (s. Abb. 1.4 A). Bei der *Cx31F137L* Mutation ist an der Aminosäure-Position 137 ein Phenylalanin (F) gegen ein Leucin (L) ausgetauscht, was auf eine Punktmutation an der Position 409 zurückzuführen ist, wo anstelle der Base Thymin die Base Cytosin zu finden ist (Schnichels et al., 2007). Bei den transgenen Mäusen wurde die Mutation durch eine homologe Rekombination, die die WT Region des *Cx31*-Gens durch eine *Cx31* kodierende Region, einem neoR Gen und einer *Cx31F137L* kodierenden Region ersetzt wurde, erzeugt (s. Abb. 1.4 B). Die *Cx31* kodierende Region und das neoR-Gen, die durch loxP Seiten flankiert sind, wurden anschließend mittels Cre Rekombinase entfernt, so dass die *Cx31F137L* Punktmutation heterozygot in der Mauslinie exprimiert wurde (Schnichels et al., 2007). Die heterozygoten *Cx31+/-F137L* Mäuse waren lebensfähig und fertil und zeigten ein normales Expressionsprofil von *Cx26*, *Cx30*, *Cx30.3* und *Cx43* in der Epidermis. Es wurden bei den Mäusen keine Erythemen beobachtet und eine Hyperproliferation des Stratum germinativum konnte auch nur in 5% der untersuchten Hautbereiche nachgewiesen werden (Schnichels et al., 2007). Interessanterweise zeigten jedoch die Plazenten der *Cx31+/-F137L* Mäuse eine veränderte Morphologie. Homozygote Embryonen des Genotyps F137L konnten gar nicht generiert werden, da sie am Tag 7.5 pc direkt nach der Implantation aufgrund einer sich nicht weiter entwickelnden Plazentaanlage abstarben. Diese Mutation, die ab dem Tag 7.5 pc zu einer 100%-igen Absterberate führt, hat somit einen deutlicheren Einfluss auf die Plazentaentwicklung, als der absolute Verlust des *Cx31* Gens, der nur zum Tod von 60% der Embryonen führte (Kibschull et al., 2004; Schnichels et al., 2007).



**Abb. 1.4: Die *Cx31F137L* Punktmutation.** **A.** Positionen, die im *Cx31* und im *Cx30.3* Gen für EKV verantwortlich sind. Die Punktmutation F137L liegt in der dritten transmembranen Domäne des Connexin31 und des Connexin30.3. **B.** Schematische Darstellung zur Generierung des *Cx31F137L* mutierten Allels. Durch homologe Rekombination wird die kodierende Region des WT *Cx31* durch eine *Cx31* WT kodierende Region, einem neoR Gen und einer *Cx31F137L* kodierenden Region ersetzt. Die *Cx31* WT kodierende Region und das neoR-Gen werden anschließend mittel Cre-Rekombinase entfernt. CT: C-Terminus, CL: Zytoplasmatische Schleife (cytoplasmatic loop), E1/E2: extrazelluläre Schleife 1/2, NT: N-Terminus, M: Transmembrandomäne (modifiziert nach Schnichels et al., 2007).

## 1.5 Hypoxie

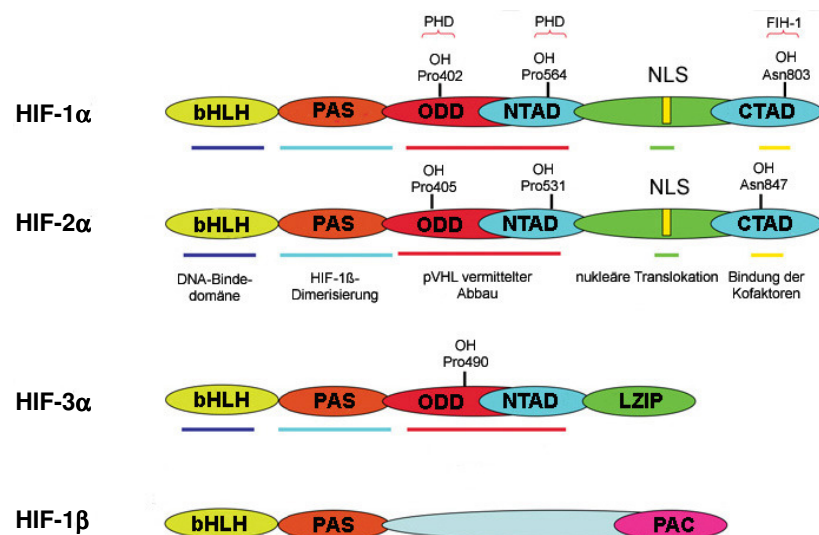
Die frühe Entwicklung der Plazenta findet im Uterus unter hypoxischen Bedingungen statt. So konnte während der frühen Schwangerschaft beim Menschen ein ungefähre Sauerstoffgehalt von 2.5% im Uterus ermittelt werden. Nachdem die Plazenta Verbindungen an das maternale Blutsystem geschlossen hat, ist sie mit ungefähr 8.6% wieder relativ  $O_2$ -reich (Rodesch et al., 1992). Die anfänglich niedrige Sauerstoffkonzentration beeinflusst die Differenzierung der Plazenta (Genbacev et al., 2001; Rosario et al., 2008). So konnte in einigen Studien gezeigt werden, dass ein niedriger Sauerstoffgehalt z.B. die Migration des Trophoblasten in das maternale Gewebe fördert, um so an die maternale Blutzufuhr zu gelangen. Dieser Prozess wird durch eine Verschiebung vom proliferativen Phänotyp zum invasiven Phänotyp begleitet und resultiert in einer stärkeren Ausbildung der Trophoblast-

Riesenzellen (Graham et al., 2000; Hayashi et al., 2005; Rosario et al., 2008). Andere Studien konnten dagegen anhand von humanen villösen Explants oder Trophoblast-ähnlichen Zelllinien belegen, dass niedrige Sauerstoffbedingungen den invasiven Phänotyp inhibieren (Zhou et al., 1997; Caniggia et al., 2000; Lash et al., 2007).

In Zellen werden die durch Hypoxie aktivierten molekularen Prozesse hauptsächlich durch die Transkriptionsfaktoren der HIF Familie (Hypoxia-inducible factor) vermittelt (Semenza et al., 1997).

### 1.5.1 Regulierung der HIF-Proteine unter Normoxie und Hypoxie

Die Familie der HIF Transkriptionsfaktoren setzt sich aus einem Heterodimer aus einer  $\alpha$  und einer  $\beta$  Untereinheit zusammen (Bardos et al., 2005; Semenza et al., 2007). Bisher sind drei verschiedene Isoformen des HIF- $\alpha$ -Proteins bekannt: HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$ , HIF-3 $\alpha$ . Die HIF- $\alpha$  Untereinheiten sind charakterisiert durch eine bHLH (basic helix-loop-helix)-PAS (Per/ARNT/Sim) - Domäne, die für die Heterodimerisierung verantwortlich ist, und einer ODD (oxygen-dependent degradation domain), über die die Stabilisierung der HIF- $\alpha$  Proteine reguliert wird (Bardos et al., 2005) (s. Abb. 1.5). Zusätzlich besitzen die HIF- $\alpha$ -Proteine noch eine N-terminale (NTAD) - und eine C-terminale Transaktivierungsdomäne (CTAD), wobei jedoch die C-terminale Transaktivierungsdomäne beim HIF-3 $\alpha$ -Protein fehlt (Bardos et al., 2005).



**Abb. 1.5: Struktur der HIF Proteine.** Schematische Darstellung von HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$ , HIF-3 $\alpha$  und HIF-1 $\beta$ . Die verschiedenen Domänen und deren Funktionen sind dargestellt. Die Hydroxylierungsstellen der PHDs bzw. der FIH-1 sind gekennzeichnet. bHLH: basic helix-loop-helix Domäne; PAS: Per/ARNT/Sim Domäne; ODD: oxygen dependent degradation Domäne, NTAD: N-terminale Transaktivierungsdomäne; CTAD: C-terminale Transaktivierungsdomäne; NLS: nukleäres Lokalisationssignal; LZIP: Leucin Zipper; PAC: PAS-assoziierte C-terminale Domäne (modifiziert nach Kenneth et al., 2008).



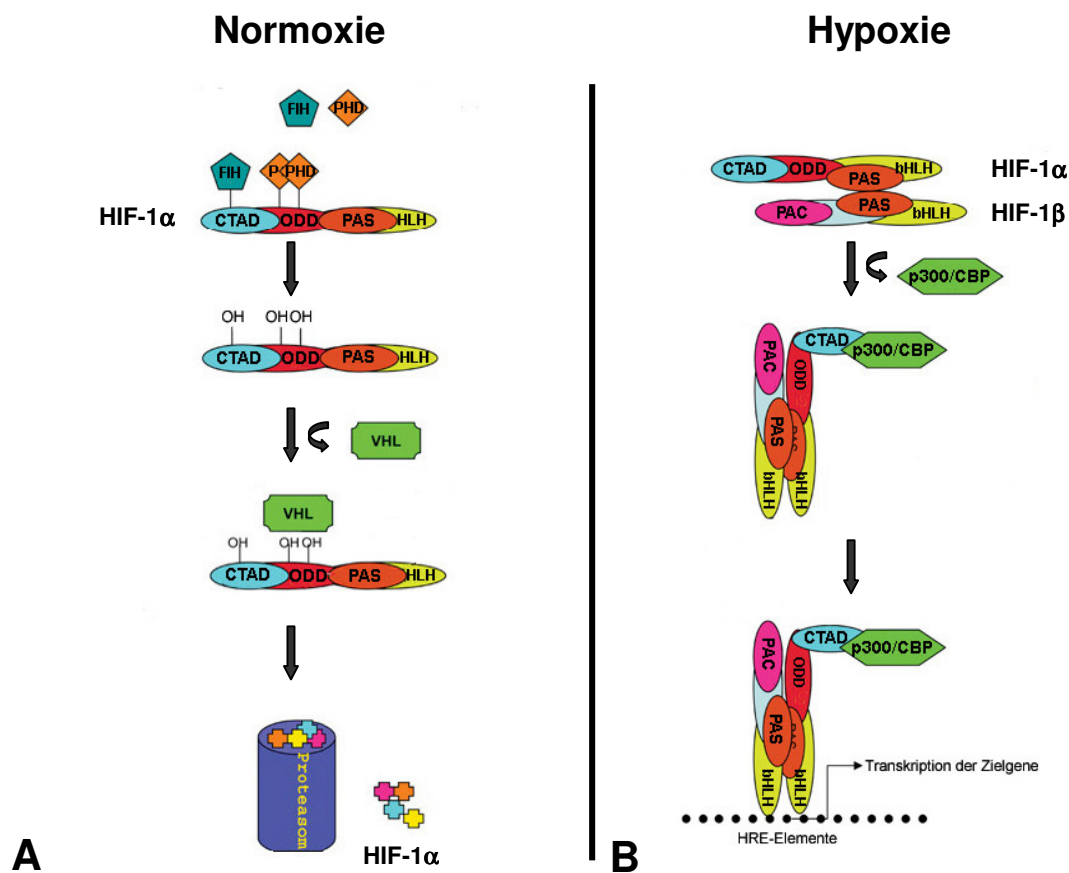
HIF-1 $\beta$ , auch als ARNT (Aryl Hydrocarbon receptor nuclear translocator) – Komplex bekannt, wird in der Zelle konstitutiv exprimiert und liegt in mehreren Splicevarianten vor (Bardos et al., 2005; Rocha et al., 2007).

Unter normoxischen Bedingungen (20%) werden die HIF- $\alpha$  Proteinuntereinheiten abgebaut. Dieser Abbauprozess wird durch die Prolylhydroxylasen (PHDs), welche Fe<sup>2+</sup>, 2-Oxoglutarat und Ascorbat - abhängige Oxygenasen sind, katalysiert (Fandrey et al., 2006). Die PHDs hydroxylieren die HIF- $\alpha$ -Untereinheiten in der ODD (Fandrey et al., 2006; Brügge et al., 2007), was zur Bindung des von-Hippel-Lindau-Tumorsuppressorproteins (pVHL) führt. Das pVHL ist eine Komponente des E3 Ubiquitin Ligase Komplexes, der die proteasomale Degradation der HIF- $\alpha$ -Proteinuntereinheit vermittelt (Salceda et al., 1997; Maxwell et al., 1999).

Von den Prolylhydroxylasen existieren vier verschiedene Isoformen (PHD1-PHD4), wobei aber nur die Isoformen 1,2 und 3 in der Lage sind das HIF-  $\alpha$ - Protein zu hydroxylieren (Fandrey et al., 2006). In Biochemischen Studien konnte gezeigt werden, dass PHD2 eine höhere Affinität zum HIF-1 $\alpha$  Protein hat, wogegen PHD1 und PHD3 eine höhere Affinität zum HIF-2 $\alpha$  Protein besitzen (Appelhoff et al., 2004). Eine homozygote Deletion von *PHD2* führt zu einer embryonalen Letalität zwischen den Tagen E12.5 und E14.5, wogegen *PHD1*- und *PHD3* Knockout Mäuse lebensfähig sind. Generierte *PHD1/PHD3* Doppelknockout Mäuse weisen eine moderate Form der Erythrozytose auf (Takeda et al., 2006; Takeda et al., 2008). Neben der Prolyl-Hydroxylierung, die durch die PHDs katalysiert wird, geschieht an der C-terminalen Transaktivierungsdomäne eine weitere O<sub>2</sub>-abhängige Hydroxylierung des HIF- $\alpha$ -Proteins, die durch die Dioxygenase FIH-1 katalysiert wird. Diese Hydroxylierung verhindert die Bindung des Co-Aktivators p300/CBP [CREB (cAMP-response-element-binding protein)-binding protein] an die HIF- $\alpha$ -Proteinunterheiten, welches für eine vollständige Aktivierung der Zielgene notwendig ist (Mahon et al., 2001; Lando et al., 2002; Lisy et al., 2008; Kenneth et al., 2008).

Unter hypoxischen Bedingungen findet kein PHD-katalysierter Abbau der HIF- $\alpha$ -Untereinheit statt, so dass eine Dimerisierung mit dem ARNT-Komplex im Zellkern erfolgen kann. Das HIF- $\alpha$ /ARNT-Heterodimer assoziiert anschließend mit den Transkriptionskoaktivatoren p300/CBP und Src-1 und bindet an die HREs (hypoxia response elements), welche spezielle DNA-Motive sind. Der HIF/Koaktivator-Komplex ist nun in der Lage die Aktivität der RNA Polymerase II Maschinerie so zu modellieren, dass die jeweiligen Zielgene induziert oder reprimiert werden (Fandrey et al., 2006). Bei den Säugetieren können die HIF-Zielgene in zwei große Kategorien eingeteilt werden: 1. Gene zur Produktion von anaerober Energie via Glykolyse–Substrate, 2. Gene zur Förderung des Sauerstoffgehaltes eines Gewebes durch Angiogenese, Vasodilation und Erythropoese (Wenger et al., 2000).

Die Etablierung von *ARNT*<sup>-/-</sup> Mäusen führte zum Tod der Embryonen an Tag E10.5. Die defizienten Mäuse zeigten kardiovaskuläre Defekte, mit anormalem Dottersack und embryonalen Blutgefäßen, einer verminderten Hämatopoese, Herzdefekten und placentaren Anomalien auf (Kozak et al., 1997; Maltepe et al., 1997; Adelman et al., 1999, 2000). Die Plazenten der *Hif1α*<sup>-/-</sup> *Hif2α*<sup>-/-</sup> Mäuse zeigten eine reduzierte Invasion in die Dezidua, einen reduzierten Spongiotrophoblasten, eine erhöhte Anzahl von Trophoblast-Riesenzellen und eine unvollständige placentare Vaskularisierung (Cowden Dahl et al., 2005).



**Abb. 1.6: Regulation von HIF-1α unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen. A.** Unter normoxischen Bedingungen wird HIF-1α von den PHDs in der oxygen dependent degradation Domäne (ODD) und von der FIH-1 in der C-terminalen Transaktivierungsdomäne (CTAD) hydroxyliert. Dieses führt zur Bindung des von-Hippel-Lindau-Tumorsuppressorproteins (VHL), welches zur Ubiquitinierung und zur proteasomalen Degradation des HIF-1α führt. **B.** Unter hypoxischen Bedingungen dimerisieren das HIF-1α und der ARNT-Komplex. Nach der Assoziation des Kofaktors p300/CBP bindet der Komplex an die HRE-Elemente im Genom und die jeweiligen Zielgene werden induziert oder reprimiert. PHD: Prolylhydroxylasen; bHLH: basic helix-loop-helix Domäne; PAS: Per/ARNT/Sim Domäne; ODD: oxygen dependent degradation Domäne, NTAD: N-terminale Transaktivierungsdomäne; CTAD: C-terminale Transaktivierungsdomäne; NLS: nukleäres Lokalisationssignal; PAC: PAS-assoziierte C-terminale Domäne; VHL: von-Hippel-Lindau-Tumorsuppressorprotein; p300/CBP: [CREB (cAMP-response-element-binding protein)-binding protein]; HRE: Hypoxia response Elemente (modifiziert nach Kenneth et al., 2008).

## 1.6 Zielsetzung

Eine normale Plazentaentwicklung/-funktion ist notwendig für die intrauterine Entwicklung des Embryos. Beeinträchtigungen der Entwicklung oder die Dysregulation von placentaren Funktionen können zur Entstehung von Schwangerschaftserkrankungen führen.

In den letzten Jahren konnten eine Reihe von Molekülen identifiziert werden, die für die korrekte Entwicklung der Plazenta notwendig sind. So spielt u.a die interzelluläre Kommunikation über Gap Junctions, die aus Connexinproteinen aufgebaut werden, eine essentielle Rolle. In der Embryonalentwicklung ist das Connexin31 das vorherrschende Protein in den Stammzellen des Trophoblasten. *Cx31* defiziente Mäuse weisen eine starke Dymorphogenese der Plazenta auf, die mit dem Absterben von 60% der Embryonen einhergeht (Plum et al., 2001). Mit Hilfe von TS-Zellen konnte gezeigt werden, dass der Verlust des *Cx31* Kanals zu einer reduzierten Proliferationskapazität und einer verstärkten Differenzierung der TS-Zellen führte (Kibschull et al., 2004).

Da auch die anfänglich niedrige Sauerstoffkonzentration, die während der Embryonalentwicklung im Uterus besteht, die Differenzierung der Plazenta beeinflusst (Genbacev et al., 2001; Rosario et al. 2008), war das Ziel der vorliegenden Arbeit, den Einfluss von Hypoxie auf das Differenzierungsverhalten von TS-Zellen zu untersuchen. Dazu sollten die Zellen unter hypoxischen Bedingungen kultiviert werden und ihr Differenzierungsverhalten anhand von Proliferationsstudien und mit Hilfe von spezifischen Markern für die verschiedenen Differenzierungswege entlang der Trophoblastzelllinie analysiert werden. Weiterhin sollte untersucht werden, ob die HIF-Proteine auch in TS-Zellen für die Hypoxie vermittelten Differenzierungsänderungen verantwortlich sein könnten.

Da der Verlust von *Cx31* in TS-Zellen zu einer verstärkten Differenzierung führt – ein Effekt der vermutlich auch durch Hypoxie induziert wird - sollten eventuelle synergistische Effekte an den *Cx31* defizienten TS-Zellen untersucht werden. Dazu sollten die Expressionsprofile der Differenzierungsmarker in *Cx31* defizienten TS-Zellen, die unter Hypoxie kultiviert worden sind, mit den Expressionsprofilen der Marker von hypoxisch kultivierten WT TS-Zellen verglichen werden, um Veränderungen in der Differenzierung zu erfassen.

Der Fokus sollte insbesondere auf dem Transkriptionsfaktor *AP-2γ* liegen, für den ein funktioneller Zusammenhang mit *Cx31* vermutet wird.

In der Gruppe von Prof. Willecke (Universität Bonn) konnten Schnichels et al. (2007) eine Maus als Modell für die humane Hautkrankheit *Erythrokeratoderma variabilis* generieren, die im *Cx31* Gen eine *F137L* Punktmutation trägt. Interessanterweise wurden keine für diese Punktmutation homozygoten Tiere erhalten, da sie direkt nach der Implantation am Tag E7.5 abstarben. Diese Punktmutation im *Cx31* Gen führt somit zu einem stärkeren Phänotyp als der Verlust des gesamten *Cx31* Kanals. Dieser Phänotyp der *Cx31F137L/F137L* Maus

---

ähnelt dem Phänotyp der *AP-2γ* defizienten Maus. Somit ist wieder ein Zusammenhang zwischen *AP-2γ* und *Cx31* zu vermuten. In der vorliegenden Arbeit soll zunächst eine Phänotypanalyse der Plazenten der heterozygoten Mäuse, die bereits einen plazentaren Defekt aufweisen, durchgeführt werden, um in weiteren Versuchen die molekularen Mechanismen anhand von TS-Zellen zu analysieren.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien, Verbrauchsmaterial und Enzyme

Agarose	Invitrogen, Karlsruhe
Ampicillin	Sigma-Aldrich, Steinheim
APS	Merck, Darmstadt
$\beta$ -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
BSA	Roth GmbH, Karlsruhe
CASYton	Schärfe, Reutlingen
Deoxycholate	Sigma-Aldrich, Steinheim
Desoxynucleotidmix	Genecraft, Münster
D-Glucose	Serva, Heidelberg
DMEM	Invitrogen, Karlsruhe
DMOG	Alexis Biochemicals, Schweiz
DMSO	Merck, Darmstadt
DnaseI	Roche, Mannheim
DTT	Sigma, Taufkirchen
EDTA	Serva, Heidelberg
Essigsäure	Roth GmbH, Karlsruhe
Ethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ethidiumbromid	Serva, Heidelberg
FCS	Invitrogen, Karlsruhe
FGF4	Tebu Biosciences, Offenbach
Formamid, deionisiert	Serva, Heidelberg
Formaldehyd 35%	Roth GmbH, Karlsruhe
Glycin	Roth GmbH, Karlsruhe
Heparin	Sigma, Taufkirchen
Hybond-N	Amersham, Freiburg
Kaliumchlorid	Riedel-de Haen, Seelze
Kaliumdihydrogensulfat	Merck, Darmstadt
L-Glutamin	Invitrogen, Karlsruhe
Luminol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Milchpulver	TSI GmbH & CO KG, Zeven

---

Methanol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Mitomycin C	Sigma-Aldrich, Steinheim
M-MLV reverse Transkriptase	Invitrogen, Karlsruhe
Mowiol	Calbiochem, Darmstadt
Natriumchlorid	Roth GmbH, Karlsruhe
Natriumhydrogencarbonat	Roth GmbH, Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat	Roth GmbH, Karlsruhe
Natriumpyruvat	Invitrogen, Karlsruhe
OligodT-Starteroligonucleotide	MWG Biosciences, Ebersberg
PBS Dulbecco	Biochrom, Berlin
Penicillin/Streptomycin-Lösung	Invitrogen, Karlsruhe
Propidiumiodid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Protease/Phosphatase Inhibitor Tablette	Roche, Mannheim
Proteinstandard	MBI Fermentas
RPMI 1640	Invitrogen, Karlsruhe
Puromycin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Röntgenfilme Kodak X-AR5	Kodak, Stuttgart
Rotiphorese®NF-Acrylamid/Bis-Lösung 40%(19:1)	Roth, Karlsruhe
Rotiquant	Roth, Karlsruhe
Puromycin	Sigma, Karlsruhe
SDS	Roth GmbH, Karlsruhe
Shandon Xylene Substitute	Thermo-Scientific, Pittsburgh, USA
Sterilfilter (0.2 µm)	Sartorius Biotech, Göttingen
Taq-DNA-Polymerase	Genecraft, Köln
TEMED N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine	Serva, Heidelberg
Tris/EDTA-Lösung	Invitrogen, Karlsruhe
Triton X-100	Roth GmbH, Karlsruhe
Trypsin/EDTA-Lösung	Invitrogen, Karlsruhe
Tween®20	Sigma-Aldrich, Steinheim
Wasserstoffperoxid	Merck, Darmstadt
Whatman Papier 3MM-Papier	Biometra, Göttingen
Zellkulturplastik	Falcon, Heidelberg

Alle verwendeten Geräte und hier nicht aufgeführten Materialien bzw. Chemikalien entsprachen dem allgemeinen Laborstandard und wurden in Analysequalität von den oben aufgeführten Firmen bezogen.

### 2.1.2 Lösungen und Kulturmedien

10 x SDS-Puffer	25 mM Tris/HCl pH 8.8; 95 mM Glycin, 0.1% SDS (w/v)
10x Transferpuffer	25 mM Tris/HCl pH 8-10.5; 192 mM Glycin
10x TBS-Puffer	20 mM Tris, 137 mM NaCl pH 7.6
TBS-T	1x TBS-Puffer, 0.15% 10%-iges Tween
Blotting-Puffer	10% (v/v) Methanol, 10% (v/v) 10x Transferpuffer
Lower-Tris	1,5 M Tris pH 8.8, 0.4% SDS
Upper-Tris	0,5 M Tris pH 6.8, 0.4% SDS
Moscona	140 mM NaCl, 4 mM KCl, 0.4 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O, 0,2 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 12 mM NaHCO <sub>3</sub> , 9 mM D-Glucose·H <sub>2</sub> O, pH 7.4
PBS/BSA	0.5-1 % (w/v) BSA (Fraktion V) in 1x PBS gelöst, pH 7.5
EMFI-Medium	DMEM, 15% (v/v) FCS, 100 µM β-Mercaptoethanol, 1x Pen/Strep
TS-Medium	RPMI 1640, 20% (v/v) FCS, 2 mM L-Glutamin, 1 mM Na- Pyruvat, 100 µM β-Mercaptoethanol, 1x Pen/Strep
FK-TS-Medium	75% (v/v) EMFI-konditioniertes TS-Medium, 25% (v/v) TS- Medium, 25 ng/ml FGF4, 1µg/ml Heparin
RIPA-Puffer	150 mM NaCl, 10 mM Tris pH 7.2, 0.1% SDS, 1% Triton X-100, 1% Deoxycholate, 5 mM EDTA, 1 Cocktailtablette (EDTA free Complete Proteinase Inhibitoren)
Ponceau-Lösung	0.5% (w/v) Ponceau S, 1% (v/v) Essigsäure
Stripping Puffer	62,5 mM Tris/HCL pH 6,7, 100 mM β-Mercaptoethanol, 2% SDS
Dissektionsmedium	200 µg/ml DNaseI in Trypsin/EDTA-Lösung

### 2.1.3 Kits

E.Z.N.A. Total RNA Kit I	Omega Bio-Tek, Norcross, USA
ECL Plus Western Blotting Detection Kit	Amersham Bioscience, Freiburg
REDExtract-N-Amp™ Tissue PCR Kit	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA

### 2.1.4 Antikörper

#### Primäre Antikörper

Rabbit-Polyclonal-Anti-HIF1α (1:100)	Novus Biologicals, Littleton, USA
Aktin Sigma A-2066 (1:600)	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA

## Sekundäre Antikörper

Goat anti-rabbit IgG-HRP (1:10000)

Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz,  
USA

## 2.1.5 Oligonukleotide

Alle Nucleotide wurden von der Firma Invitrogen bezogen.

**Tab. 2.1: Verwendete Oligonukleotide, die sowohl für die RT-PCR als auch für die qRT-PCR verwendet wurden. Alle Oligonukleotide wurden mausspezifisch eingesetzt.**

Primer-bezeichnung	Accession number	Sequenz (5' → 3')	Position	Fragment-größe (bp)
Cdx2 -F Cdx2-R	NM007673	TCCTGCTGACTGCTTTCTGA CCCTTCCTGATTTGTGGAGA	1619-1638 1763-1782	145
Eomes-F Eomes-R	NM10136	CCTGGTGGTGTGTTTGTG AATCCAGCACCTTGAACGAC	2475-2494 2675-2694	201
Tpbpa-F Tpbpa-R	NM009411	CCAGCACAGCTTTGGACATCA AGCATCCAACTGCGCTTCA	48-68 145-163	116
Cx31-F Cx31-R	NM008126	GTCTACTAGCGCTGGGATGG GTGCCAAACCTTCTCATGGT	1153-1172 1360-1379	226
Cx26-F Cx26-R	NM008125	GACACAGTGCCAAACCATCCAGA ACGGTGAGCCAGATCTTTCCAA	203-224 290-308	106
Cx43-F Cx43-R	NM010288	GCGTGAGGAAAGTACCAAC CCAGCAGTTGAGTAGGCTTG	75-90 275-285	210
Gcm1-F Gcm1-R	NM008103	CGATGTGAACTGCCTCAGA CTTCCTCTGTGGAGCAGTCC	245-264 440-459	196
AP-2γ-F AP-2γ-R	NM009335	CCTGGGCAGACAAGAACTC AGCTGCCTGCTAAGAGCATC	1876-1895 2097-2116	241
PI-1-F PI-1-R	NM008864	TGGAGCCTACATTGTGGTGGA TGGCAGTTGGTTTGGAGGA	32-52 145-163	132
β-Aktin-F β-Aktin-R	X03672	AGCCATGTACGTAGCCATCC CTCTCAGCTGTGGTGGTGAA	470-489 678-697	228
<sup>1</sup> PHD1-F <sup>1</sup> PHD1-R	NM053208	CATCAATGGGCGCACCA GATTGTCAACATGCCTCACGTAC	1132-1148 1186-1208	77
<sup>1</sup> PHD2-F <sup>1</sup> PHD2-R	NM053207	TAAACGGCCGAACGAAAGC GGGTTATCAACGTGACGGACA	6-24 61-81	76
<sup>1</sup> PHD3-F <sup>1</sup> PHD3-R	NM028133	CTATGTCAAGGAGCGGTCCAA GTCCACATGGCGAACATAACC	630-650 685-705	76
HIF-1α-F HIF-1α-R	NM010431	TCAGAGGAAGCGAAAAATGGA AGTCACCTGGTTGCTGCAATAAT	2435-2455 2495-2517	82

<sup>1</sup>: aus Takeda et al., 2006

F : forward Primer

R : reverse Primer

## 2.1.6 Versuchstiere

Die Zucht und Haltung der Versuchstiere der Art *Mus musculus* erfolgten im Zentralen Tierlabor des Universitätsklinikum Essen unter der Leitung von PD Dr. Hilken. Die Mäuse wurden dabei in einer kontrollierten, pathogenfreien Umgebung mit einem reguliertem Licht/Dunkel Zyklus (12h/12h) gehalten und hatten unbegrenzten Zugang zu Nahrung und



Wasser. Es fanden ausschließlich den Richtlinien entsprechende autoklavierte Käfige mit Filterhaube Verwendung.

Die Verpaarung der Mäuse erfolgte nach Whitten und Champlin (1978), wobei ein Männchen mit 1-2 Weibchen zusammengesetzt wurde. Aufgrund des konstanten Licht/Dunkel Zyklus erfolgte die Fertilisation gegen Mitternacht (Sommerzeit), ca. 2h nach der Ovulation. Eine stattgefunden Kopulation konnte am nachfolgenden Tag durch einen Vaginalplug erkannt werden. Dieser Zeitpunkt wird als Tag 0.5 der Schwangerschaft festgesetzt.

Zur Gewinnung von mäuseembryonalen Fibroblasten und zum Einkreuzen transgener Tiere wurde der Inzuchtstamm C57BL/6J aus der Zucht des Zentralen Tierlabors des Universitätsklinikum Essen verwendet.

Die Connexin31 defiziente Mauslinie wurde freundlicherweise von Prof. Dr. Willecke (Universität Bonn) zur Verfügung gestellt und von Dr. Kibschull in Essen weiter gezüchtet. Durch eine gerichtete Insertion wurde die gesamte kodierende Region des Cx31-Gens stromabwärts vom Startcodon, sowie der 3'-untranslatierte Bereich durch ein lacZ-Reportergen und ein neoR-Gen unter der Kontrolle des MCI-Promotors ersetzt (Plum et al., 2001).

Die *Cx31<sup>+/F137L</sup>* Mauslinie wurde ebenfalls von Prof. Dr. Willecke (Universität Bonn) zur Verfügung gestellt. Durch eine homologe Rekombination wurde die WT Region des *Cx31*-Gens durch eine *Cx31* kodierende Region, ein *neoR*-Gen und einer *Cx31F137L* kodierenden Region ersetzt. Die kodierende *Cx31* Region und das *neoR*-Gen, die durch loxP Seiten flankiert waren, wurden anschließend mittels Cre Rekombinase entfernt, so dass die *Cx31F137L*-Punktmutation heterozygot in der Mauslinie expremiert wurde (Schnichels et al., 2007). Der Hintergrundstamm beider Mauslinien ist C57BL/6J.

Alle Organentnahmen und Versuche wurden in Übereinstimmung mit den Gesetzen der Bundesrepublik Deutschland sowie des Landes Nordrhein-Westfalen durchgeführt.

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Zellbiologische Methoden

Die Inkubation der verwendeten Säugerzellen wurde in Brutschränken (Nuaire) unter 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, einer wassergesättigten Atmosphäre und Partialdruck durchgeführt. Die Zellen wurden unter normoxischen (21% O<sub>2</sub>) oder hypoxischen (3% O<sub>2</sub>) Bedingungen kultiviert. Alle Arbeiten an den Zellkulturen wurden in Sterilbänken der Firma Nuaire durchgeführt.

Für die Kultur wurden Zellkulturschalen und Lochplatten der Firma-Falcon (Heidelberg) verwendet.

### **2.2.1.1 Präparation embryonaler Mausfibroblasten**

Embryonale Mausfibroblasten (EMFI) dienen der Herstellung von konditioniertem Medium für die Trophoblast-Stammzellkultur. Sie geben noch nicht identifizierte Substanzen ins Medium ab, die den Stammzellcharakter der TS-Zellen aufrecht erhalten. Zur Isolierung von EMFI wurden murine Embryonen an Tag 12.5-14.5 pc gewonnen. Unter sterilen Bedingungen wurden die Embryonen mit DMEM gewaschen und der Kopfschädel unterhalb der Augen, der Schwanz, die Extremitäten, sowie die blutzuführenden Organe entfernt. Die Rumpfe wurden 3 mal mit DMEM gewaschen und anschließend mechanisch fein zerkleinert. Der Gewebepulver wurde in 35 ml Dissektionsmedium überführt und anschließend für 10 min bei 180 Upm bei 37°C geschüttelt. Der Überstand wurde anschließend abgenommen und mit 1 Vol. EMFI-Medium abgestoppt. Auf die abgesetzten Gewebestücke wurden erneut 35 ml Dissektionsmedium gegeben und der Ansatz wie oben beschrieben aufgearbeitet. Der Vorgang wurde insgesamt 3 mal durchgeführt und die gesammelten Überstände anschließend vereinigt. Die Zellen aus dem Überstand wurden abzentrifugiert und in EMFI-Medium mit einer Dichte von  $5 \times 10^6$  Zellen auf 10 cm Kulturschalen ausplattiert. Nach Erreichen einer Konfluenz von ca. 90% wurden die Zellen eingefroren.

### **2.2.1.2 Herstellung von Fibroblasten-konditioniertem Medium**

Zur Herstellung von konditioniertem Medium wurden die isolierten EMFI durch Mitomycin C in der G1-Phase der Mitose arretiert, um ein Überwachsen zu verhindern. Dazu wurde eine konfluente EMFI-Kultur mit 1 µg/ml Mitomycin C-Medium für 4h bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Nach der Inkubation wurde das Medium abgenommen, die Kultur mehrmals mit PBS gewaschen und mit 10,5 ml TS-Medium/pro Schale beschichtet. Das TS-Medium wurde für drei Tage konditioniert und abschließend zentrifugiert, filtriert und zur Lagerung bei -20°C eingefroren.

### **2.2.1.3 Kultivierung von Trophoblast-Stammzellen**

Die Etablierung der Wildtyp- und der *Cx31* defizienten Trophoblast-Stammzellen wurde von Dr. Mark Kibschull durchgeführt (Kibschull et al., 2004). Die Kultivierung der Zellen fand im FK-TS-Medium statt, wobei das FGF4 und das Heparin immer kurzfristig vor der Verwendung zugesetzt worden sind. Unter diesen Kulturbedingungen wurden die TS-Zellen im undifferenzierten und proliferativen Zustand gehalten (Stammzell-Bedingungen). Der Mediumwechsel erfolgte alle 2-3 Tage. Bei Erreichen einer 80-90%-igen Konfluenz wurden die Zellen passagiert. Dazu wurde die Kultur kurz mit Mosconalösung gewaschen, mit Trypsin/EDTA-Lösung überschichtet und bis zur Ablösung der Zellen im Brutschrank

inkubiert. Die enzymatische Reaktion wurde durch Zugabe von 5 ml TS-Medium abgestoppt und die Zellen anschließend bei 800 UpM für 3 min in einer Haereus Tischzentrifuge sedimentiert. Die Zellen wurden dann in einer entsprechenden Verdünnung in ein neues Kulturgefäß überführt.

Zur Langzeitlagerung wurden die Trophoblast-Stammzellen aus einer konfluenten Kultur in 900 µl TS-Medium gelöst, mit 100 µl DMSO versetzt und graduell in Kryo-Röhrchen in flüssigen Stickstoff eingefroren.

Zum Auftauen der Zellen wurden diese dem Stickstoff entnommen und in ein 37°C Wasserbad überführt. Nach einem Waschgang wurden die Zellen in der gewünschten Verdünnung in frischem Medium aufgenommen und ausplattiert.

#### **2.2.1.4 Differenzierungsreihen von TS-Zellen**

Undifferenzierte TS-Zellen wurden nach dem Auftauen bis zum Erreichen der Konfluenz in einer T75-Zellkulturflasche unter normoxischen Bedingungen kultiviert. Die Zellen wurden anschließend mit einer Dichte von 100.000 Zellen/6well in FK-TS-Medium ausplattiert und unter Normoxie weiterkultiviert oder entsprechend in ein hypoxisches Milieu überführt.

Zur Untersuchung der frühen Stammzellmarker wurden die Zellen nach 2h, 4h und 6h von jeweils 3-4 wells abgelöst und anschließend die Gesamt-RNA (s. 2.2.3.1) isoliert. Zur Analyse der späteren Differenzierungsmarker wurden die Zellen nach 24h (Tag 0) Inkubation in proliferativem Medium in TS-Medium überführt. Da beim TS-Medium kein konditioniertes Medium, kein FGF4 und kein Heparin zugesetzt wurden, wurde die Differenzierung der Zellen eingeleitet. Die Ernte der Zellen erfolgte an den Tagen 0, 1, 2, 3 und 5.

Für die Analyse des Einflusses von unterschiedlichen Kultivierungsbedingungen auf das Differenzierungsverhalten der TS-Zellen, wurden die TS-Zellen direkt nach dem Auftauen in zwei T25 Zellkulturflaschen überführt und entweder unter Normoxie oder Hypoxie in Stammzellmedium inkubiert. Bei Erreichen der notwendigen Zellzahl wurden die Zellen, wie oben beschrieben, ausplattiert und anschließend ausdifferenziert und geerntet.

#### **2.2.1.5 Zellproliferationsanalyse**

In einer 12well-Platte wurden 50.000 TS-Zellen in FK-TS-Medium ausplattiert und unter normoxischen oder hypoxischen Bedingungen kultiviert. Nach 24h (Tag 0) wurde das FK-TS-Medium durch TS-Medium (Differenzierungsmedium) ersetzt. An Tag 0, 1, 2, 3, 5, 7 und 9 wurden die Zellen durch Trypsinierung gesammelt und die Gesamtzellzahl im CASY-Counter der Firma Schärfe System bestimmt. Für jeden Tag wurden Messungen von drei unabhängigen Experimenten durchgeführt.

### **2.2.1.6 Zugabe von DMOG**

Um den Einfluss vom HIF-1 $\alpha$  Protein auf die Trophoblast-Stammzelldifferenzierung näher zu untersuchen, wurden die TS-Zellen mit Dimethyloxaloylglycin (DMOG), welches ein Inhibitor der proteosomalen Degradation des HIF-1 $\alpha$  Proteins ist, unter normoxischen Bedingungen kultiviert. Dazu wurden 500.000 Zellen auf eine 60 mm Zellkulturschale in FK-TS-Medium ausplattiert, mit der entsprechenden Menge DMOG (Stocklösung: 100  $\mu$ M in PBS) versetzt und für 2h unter normoxischen Bedingungen inkubiert. Die anschließende Proteinaufreinigung fand wie unter 2.2.2.2 beschrieben statt.

Eine anschließende Differenzierungsreihe der TS-Zellen fand wie unter 2.2.1.4 beschrieben statt, wobei dem Medium hier die entsprechende Menge DMOG (Endkonzentration 0.5 mmol/6well) zugesetzt wurde. Die Zellen der Kontrollansätze blieben unbehandelt.

### **2.2.1.7 Morphometrie**

Für die Auszählung der Trophoblast-Riesenzellen wurden die TS-Zellen wie unter 2.2.1.4 beschrieben behandelt. An Tag 0, 1, 2, 3, 5, 7 und 9 wurden die Zellen von unabhängigen Differenzierungsreihen drei verschiedener Klone mittels eines Zeiss Axiophot Mikroskopes und einer Nikon DS-U1 Kamera dokumentiert. Die anschließende Zellzählung und Ermittlung der Zellfläche wurden mit der LUCIA Image Analysis Software (Nikon) durchgeführt. Pro Differenzierungsreihe und pro Tag wurden 3-4 6wells ausgezählt und die Anzahl der Trophoblast-Riesenzellen auf 100 Gesamtzellen der Kultur berechnet. Von den gezählten Trophoblast-Riesenzellen wurde anschließend die Zellfläche ermittelt und pro Differenzierungsreihe ein Mittelwert gebildet.

## **2.2.2 Proteinbiochemische Methoden**

### **2.2.2.1 Kultivierung der TS-Zellen für den Western-Blot**

500.000 TS-Zellen wurden auf 60 mm Petrischalen ausplattiert und in FK-TS-Medium unter normoxischen Bedingungen kultiviert. Ein Versuchsansatz wurde nach 24h in Hypoxie überführt, während der Kontrollansatz weiterhin unter Normoxie kultiviert wurde. Nach 2h und nach 48h Inkubation erfolgte die Ernte der Zellen (s. 2.2.2.2). Ein weiterer Versuchsansatz wurde zusätzlich für 2 Tage in Differenzierungsmedium kultiviert.

### **2.2.2.2 Protein-Isolierung und Konzentrationsbestimmung**

Zur Isolierung der Proteine wurden die Zellen in 200  $\mu$ l RIPA-Puffer pro Petrischale mit einem Zellschaber geerntet, in ein Reaktionsgefäß überführt und mit einer Kanüle (20G x 1  $\frac{1}{2}$ ; 0,9 mm x 40mm, Beckton Dickinson, Fraga, Spanien) homogenisiert. Das Zell-Puffer-Gemisch wurde für 20 Minuten auf Eis belassen, gevortext und danach 10 Minuten bei 4°C

und 13000 rpm in einer kühlenden Tischzentrifuge (Sigma) zentrifugiert. Der Überstand, der das Protein beeinhaltet, wurde abgenommen und für die Proteinbestimmung eingesetzt.

Die Proteinbestimmung erfolgte nach Bradford mit der den Farbstoff CBBG250 („Coomassie Brilliant Blue-G250“) enthaltenden Roti-Quant-Lösung. CBBG250 geht durch die Bindung an ein Protein vom kationischen roten in den anionischen blauen Zustand über. Bei Zugabe der Proben konnte eine Änderung der Absorption bei 595 nm Wellenlänge quantifiziert werden. Dazu wurden 2 µl der Proteinlösung mit 798 µl Aqua dest. und 200 µl Roti-Quant-Lösung versetzt (1:500 Verdünnung). 800 µl Aqua dest. und 200 µl Roti-Quant-Lösung dienten als Leerwert. Unter Verwendung von BSA als Eichprotein wurde eine Standardkurve erstellt und mit Hilfe des BioPhotometer plus (Eppendorf, Hamburg) die Proteinkonzentration bestimmt.

### 2.2.2.3 Western Blot

Die Quantifizierung der Protein-Expression erfolgte mit Hilfe der Western Blot Methode. Dazu wurde die denaturierende SDS-PAGE (Sodium-Dodecyl-Sulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese) nach Laemmli (1970) durchgeführt. Bei dieser Methode werden Proteine durch ein elektrisches Feld in einem SDS-Gel auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen und anschließend durch spezifische Antikörper nachgewiesen. Die hier verwendeten Antikörper sind in 2.1.4 aufgeführt.

Es wurden 7,5%ige Trenngele und 4%ige Sammelgele verwendet. Die zu untersuchenden Proteinlösungen enthielten 30 µl Probenvolumen und 50 µg Protein. Nachdem die Proben mit Probenpuffer (2x Probenpuffer, 3% β-Mercaptoethanol) gemischt wurden, erfolgte eine 5 minütige Denaturierung der Proteine bei 100°C. Neben der Beladung des Gels mit 50 µg Protein pro Geltasche wurde zusätzlich eine Tasche mit einem Größenmarker (Cruz Marker MW Standards, sc-2035) beladen. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Spannung von 150V bis zum Auslaufen der Bromphenolfront (ca. 1,5h). Der Transfer der Proteine von den Gelen auf eine Nitrocellulose-Membran wurde mit einer Elektroblokkammer von BioRad durchgeführt. Erstmals wurden zwei Lagen Vlies, das Whatman-Papier und die Nitrocellulose-Membran in 1x Blotting-Puffer getränkt. Es folgte der Aufbau der Blokkammer: Auf ein Vlies folgten zwei Lagen Whatman-Papier, das SDS-Trenngel, die Nitrocellulose-Membran, erneut zwei Lagen Whatman-Papier und ein weiteres Vlies. Das Gestell wurde dann in die eisgekühlte Elektroblokkammer eingespannt und für zwei Stunden bei RT bei einer Stromstärke von 60mA von der Kathode zur Anode geblottet.

Um unspezifische Antikörperbindungsstellen zu blockieren, wurden die Nitrocellulose-Membranen 1h bei Raumtemperatur in einer 5%igen Lösung aus fettfreier Milch in TBS-T inkubiert. Die Inkubation mit dem primären Antikörper, der in 2% TBS-T verdünnt worden ist, erfolgte anschließend für 1,5h oder über Nacht bei 4°C. Nach Abschluss der Inkubation wurde die Nitrocellulose-Membran dreimal mit TBS-T gewaschen. Der Komplex aus primärem Antikörper und Protein kann durch einen sekundären Antikörper, der HRP-

gekoppelt (Horse Radish Peroxidase) ist, nachgewiesen werden. Dieser sekundäre Antikörper ist gegen das Immunglobulin des primären Antikörpers gerichtet. Dazu wurden die Nitrocellulose-Membranen mit dem entsprechenden sekundären Antikörper für 45 min in 2%-igem Milchpulver bei Raumtemperatur inkubiert. Der Nachweis der Reaktion erfolgte mit dem Amersham-ECL-Kit entsprechend den Angaben des Herstellers.

### **2.2.3 Molekularbiologische Methoden**

#### **2.2.3.1 Isolierung und Konzentrationsbestimmung von RNA**

Die Isolierung der Gesamt-RNA aus den TS-Zellen wurde mit Hilfe des E.Z.N.A. Kits (Omega, Doraville, Georgia, USA) durchgeführt. Die Zellen wurden zweimal mit Moscona gewaschen und anschließend die entsprechende Menge TRK-Lysispuffer und  $\beta$ -Mercaptoethanol hinzugegeben. Daraufhin konnten die Zellen mit einem Zellschaber abgekratzt und durch mehrfaches Aufziehen durch eine Kanüle (20G x 1 1/2; 0,9 mm x 40 mm, Beckton Dickinson, Fraga, Spanien) lysiert werden. Die weitere Aufreinigung erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers. Die RNA wurde in 50  $\mu$ l RNase freiem Wasser eluiert.

Die Konzentrationsbestimmung erfolgte im BioPhotometer plus (Eppendorf). Nukleinsäuren weisen in Lösung eine Absorption von UV-Licht mit einem Maximum von 260 nm auf. Dabei ist die Konzentration der Lösung proportional zur gemessenen Extinktion. Eine Extinktion von 1,0 entspricht einer RNA-Konzentration von 40  $\mu$ g/ml. Die erhaltene RNA kann bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert werden.

#### **2.2.3.2 Reverse Transkription (RT)**

Der RT-Reaktion geht ein DNaseI Verdau voraus, um mögliche chromosomale DNA-Kontaminationen in der isolierten Gesamt-RNA zu beseitigen. Das Enzym DNaseI ist in der Lage einzel- und doppelsträngige DNA abzubauen ohne die vorhandene RNA zu beschädigen. Dazu wurde nach dem Protokoll von Invitrogen 2  $\mu$ g Gesamt-RNA mit der entsprechenden Menge „high performance liquid chromatography“ HPLC gereinigtem Wasser auf ein Volumen von 17  $\mu$ l eingestellt und anschließend 2  $\mu$ l 10x DNase Puffer (Invitrogen) und 1  $\mu$ l DNase I (1 U/ $\mu$ l, Invitrogen) zugegeben. Nach 15 min Inkubation bei RT wurde die DNase durch 10 min Inkubation bei 65°C inaktiviert.

Bei der reversen Transkription wird aus der isolierten RNA ein komplementärer DNA-Strang mit Hilfe des Enzyms M-MLV RT („moloney-murine leukemia virus reverse transcriptase“, 200U/ $\mu$ l, Invitrogen, Karlsruhe) synthetisiert (cDNA). Dazu wurden 2  $\mu$ g der mit DNaseI verdauten RNA mit dem RT-Mastermix versetzt und für 1h bei 37°C im Thermocycler inkubiert. Als Oligonukleotid-Primer dienten hierbei die Oligo-dT<sub>16</sub>-Oligonukleotide (Invitrogen, Hamburg). Zur Denaturierung von DNA/RNA-Hybriden und Inaktivierung des

Enzyms wurden die Proben abschließend 5 Minuten bei 90° erhitzt. Die erhaltende cDNA kann bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert werden.

### 2.2.3.3 Semiquantitative PCR

Zum Nachweis der Transkripte und zur relativen Quantifizierung der Expression der unterschiedlichen Gene wurde die semiquantitative PCR in einem Thermocycler nach dem unten angegebenen Programm durchgeführt. Dazu wurden routinemäßig 4 µl des reversen Transkriptionsansatzes mit genspezifischen Primern (s. 2.1.5) in die PCR eingesetzt. In einem Parallelansatz wurde das konstitutiv exprimierte ACTB-Gen amplifiziert.

#### PCR-Ansatz:

4 µl	RT-Ansatz
5 µl	10x-Puffer (Biotherm)
1 µl	dNTPs
1 µl	Primer -F, -R (25 pmol/µl)
0,5 µl	Taq-Polymerase (5U/µl)
ad 50 µl	H <sub>2</sub> O

#### PCR-Programm im Thermocycler:

2 min	94 °C	} 35 Zyklen
45 sec	94 °C	
45 sec	60 °C	
2 min	72 °C	
5 min	72 °C	

Nach der Amplifikation wurden die Transkripte mit DNA-Probenpuffer (10x) versetzt und in einem 2%-igen Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt (s. 2.2.3.4).

### 2.2.3.4 Agarose-Gelelektrophorese

Mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese können Nukleinsäuren der Größe nach aufgetrennt werden und mit Hilfe von Ethidiumbromid im Gel sichtbar gemacht werden. Aufgrund der Größe der erwarteten DNA-Fragmente (ca. 80 bp) wurden hier 2%-ige Agarosegele verwendet, die mit Ethidiumbromid (1% w/v) versetzt worden sind. Als Laufpuffer diente 1x TBE-Puffer. Die DNA-Proben wurden mit 10x DNA-Probenpuffer versetzt. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei einer angelegten Spannung von 120V. Die Analyse der einzelnen Banden wurde an dem Geldokumentationsgerät UVT-20ME (Herolab Laborgeräte GmbH) vorgenommen. Die densitometrische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Programms TINA 2.09g (Raytest Isotopenmessgeräte, Staubenhardt).

### 2.2.3.5 Quantitative Real-Time-PCR

Bei der Methode der quantitativen Real-Time-PCR wird dem Reaktionsansatz der Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green zugesetzt, der mit Doppelstrang-DNA einen charakteristisch fluoreszierenden Komplex eingeht. Somit lässt sich bei jedem Zyklus der PCR die Fluoreszenz als Maß für die Produktentstehung verfolgen. Zudem kann am Ende der Reaktion eine Schmelzkurve des Produktes aufgenommen werden. Dadurch ist überprüfbar, ob mehrere Produkte entstanden sind. Die Daten über den Anstieg der Fluoreszenz bei der PCR-Reaktion lässt auf die Ausgangsmenge der amplifizierten Sequenz schließen. Dazu wird die Anzahl der Temperaturzyklen ( $C_t$ -Wert) bestimmt, ab der die Fluoreszenz einen fixen Wert innerhalb der exponentiellen Phase der Reaktion erreicht (Gibson et al., 1996). Je höher der  $C_t$ -Wert beispielsweise ist, je mehr Zyklen also notwendig sind, um den einer bestimmten Produktmenge entsprechenden Fluoreszenzwert zu erreichen, desto geringer war die Ausgangsmenge der amplifizierten DNA.

Um die unterschiedlichen Mengen verschiedener cDNAs vergleichend quantifizieren zu können, muss die Effizienz der Reaktionen mit den unterschiedlichen Primerpaaren identisch sein.

Für die Durchführung der quantitativen Real-Time-PCR wurden 1 µl der cDNA (2.2.3.2) jeder zu untersuchenden Probe mit 19 µl qPCR MasterMixes SYBR Green I (Applied Biosystems) nach Angaben des Herstellers versetzt. Im Ansatz wurden die Primer in einer Konzentration von 25 pmol/µl verwendet. Jede Probe wurde in einem dreifachen Ansatz amplifiziert.

Die Reaktionen der Real-Time-PCR wurde mit dem „ABI Prism 7300 Sequence Detection System“ (Applied Biosystems) in einer 96-Well Platte (96well optical reaction plate, Applied biosystems), die von einer Folie (qPCR opti-seals, Eurogentic) verschlossen wurde, durchgeführt. Das PCR Programm beinhaltete folgende Schritte: Einer zweiminütigen Erhitzung der Proben bei 50°C folgte die Aktivierung der Taq-Polymerase für 10 Minuten bei 95°C. Den 3. Schritt des Programms, der 40x wiederholt wurde, bildete eine 15 sekündige Erhitzung bei 95°C mit einer 1 minütigen Inkubation bei 60°C. Abschließend wurden für die Ermittlung der Schmelzkurven die Proben in 0,1°C Schritten von 60°C auf 90°C erhitzt und deren Fluoreszenzintensität gemessen.

Für die relative Quantifizierung wurde die vergleichende  $C_t$ -Methode ( $\Delta\Delta C_t$ -Methode) verwendet. Bei dieser Methode wurde von dem ermittelten  $C_t$ -Wert einer zu untersuchenden Probe der entsprechende  $C_t$ -Wert, der für die  $\beta$ -Aktin-Expression gemessen worden ist, abgezogen und man erhielt so den  $\Delta C_t$ -Wert. Bei der vergleichenden  $C_t$ -Methode werden die gemessenen Expressionen mit einem eigenhändig festgelegten Calibrator verglichen. Beim Vergleich der Genexpression der verschiedenen Differenzierungsmarker wurde immer die Expressionsstärke des jeweiligen Genes an Tag 0, unter Normoxie kultiviert, als Calibrator festgelegt. Die  $\Delta C_t$ -Werte, d.h. die gegen  $\beta$ -Aktin abgeglichenen Expressionslevel der



verschiedenen Gene, wurden für jeden untersuchten Zeitpunkt als Mittelwert zusammengefasst und davon wurde der  $\Delta\text{-C}_t$ -Wert des festgesetzten Calibrators abgezogen. Der so erhaltene Wert ist der  $\Delta\Delta\text{-C}_t$ -Wert. Mit der Formel  $2^{-(\Delta\Delta\text{-C}_t)}$  wurde anschließend die x-fache Genexpression einer Probe verglichen mit der Calibratorprobe berechnet. Die Auswertung wurde mit dem Programm Excel durchgeführt.

### 2.2.3.6 Genotypisierung der *Cx31F137L*-Mäuse

Zur Bestimmung des Genotyps wurde mit einer Schere ein Stück vom Ohrappen oder von der äußersten Schwanzspitze einer Maus abgetrennt und anschließend wurde daraus die DNA mittels des REExtract-N-Amp<sup>TM</sup> Tissue PCR Kit (Sigma-Aldrich, Saint-Louis) nach Herstellerangaben isoliert. Die isolierte DNA wurde dann in einer Polymerasekettenreaktion nach Herstellerangaben mit den entsprechenden Starteroligonukleotiden (s. Tab. 2.2) eingesetzt. Nach der Amplifikation wurden die Transkripte mit DNA-Probenpuffer (10x) versetzt und in einem 2%-igen Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt (s. 2.2.3.4). Bei folgendem Genotyp wurden folgende Banden erwartet:

**WT:** 500 bp

**F137L:** 651 bp

#### PCR-Programm im Thermocycler:

4 min	94 °C	} 34 Zyklen
30 sec	94 °C	
45 sec	60 °C	
1 min	72 °C	
10 min	72 °C	

**Tab. 2.2: Primersequenzen für die Genotypisierung**

Primerbezeichnung	Sequenz (5' → 3')
Mausprimer_For Genotyp_Cre_For	CTCAAAGCTAGTCTGAGATGC
Mausprimer_Rev 1 Cx31_hom_Rev	TAGTTCTAGAGCGGCCAATTC
Mausprimer_Rev_2 Genotyp_Cre_Rev	GCATCACAAGGCTCCTAAGAA

## 2.2.4 Morphologische Methoden

### 2.2.4.1 Präparation der *Cx31+ / F137L*-Mausplazenta

Die *Cx31+ / F137L*-Mäuse wurden wie unter 2.1.6 beschrieben verpaart und nach erfolgreicher Kopulation wurden die Plazenten an den Tagen 12.5 dpc und 14.5 dpc präpariert. An den Tagen 12.5 dpc und 14.5 dpc wurden zur Genotypisierung der Plazenten die Amnionhüllen der Embryonen eingesetzt. Weiterhin wurden die Gewichte von den Plazenten und Embryonen mit der ABS 120-4 Feinwaage (Kern GmbH) ermittelt.

#### 2.2.4.2 Histologische Analyse

Die präparierten Gewebe wurden für 24h in 4% Formalin fixiert und anschließend mit Hilfe eines Einbettautomaten (Citadell 1000 Shandon, Frankfurt) zunächst in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und anschließend in Paraffin eingebettet. Die Präparatschnitte von dem eingebetteten Gewebe wurden dann an einem Mikrotom (Reichert-Jung) mit einer Schichtdicke von 7  $\mu$ m hergestellt und für morphologische Untersuchungen mittels Hämatoxylin-Eosin (2.2.4.3) angefärbt (Noci et al., 1995).

Die anschließende Ermittlung der durchschnittlichen Labyrinthdicke und die Größe der sinusoiden Gefäße wurden bei einer 20fachen Vergrößerung mit Hilfe der Lucia Image Analysis Software (Nikon) durchgeführt.

#### 2.2.4.3 Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung

Die Paraffinschnitte wurden zunächst in Histoclear entparaffiniert, anschließend durch eine absteigende Alkoholreihe (96-40%) hydriert und mit einer Hämatoxylin-Eosin-Lösung nach Shandon gefärbt. Hämatoxylin ist ein natürlicher Farbstoff, der in Form des basischen Hämaun alle Strukturen, die basophil sind, intensiv blau färbt, z.B. DNA oder Zellkerne.

Eosin ist ein synthetischer Farbstoff, der alle Zellstrukturen rot färbt, die acidophil sind. Dazu gehören vor allem die Proteine des Zytoplasmas.

Nach der Hämatoxylin-Eosin-Färbung wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert und mit Histomount eingedeckt.

### 2.2.5 Statistische Auswertung

Für die statistische Auswertung der Expressionsanalysen und der Proliferationsstudien wurden im Falle der WT TS-Zellen jeweils drei unabhängige Messungen mit drei verschiedenen Zellklonen durchgeführt. Zur Analyse der Expressionsprofile und des Proliferationsverhaltens der *Cx31* KO TS-Zellen wurden vier unabhängige Versuchsreihen mit vier unterschiedlichen Zellklonen eingesetzt.

Bei der histologischen Auswertung der *Cx31*+/F137L Plazenta wurden von jedem Genotyp mindestens vier verschiedene Embryonen und Plazenten gewogen und näher untersucht. Zur Ermittlung des Labyrinthdurchmessers und der Fläche der maternalen Sinusoide wurden für jede einzelne Plazenta 5 aufeinanderfolgende Schnitte im Bereich der Allantois vermessen.

Die Signifikanz ( $p \leq 0.05$ ) der jeweiligen erhaltenden Werte wurde mit dem Mann-Whitney-Test mit Hilfe der Software SPSS 16.0 (Windows) ermittelt.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Der Einfluss von Hypoxie auf das Differenzierungsverhalten von WT und Cx31 defizienten TS- Zellen

Es ist bekannt, dass die Entwicklung der Präimplantationsembryonen und die frühe Plazentation im Uterus unter hypoxischen Bedingungen stattfinden. So liegt in vivo eine ungefähre Sauerstoffkonzentration von 2-3% im Uterus vor, in der die Proliferations- und Differenzierungsvorgänge der unterschiedlichen Zelltypen der Blastozyste (ES-Zellen, XEN-Zellen, TS-Zellen) geschehen (Rodesch et al., 1992). Es soll nun anhand von bereits etablierten TS-Zellen (Kibschull, 2004) die Auswirkung der Hypoxie auf das Differenzierungsverhalten von TS-Zellen mit Hilfe von spezifischen Markergenen untersucht werden. Bei diesen Differenzierungsstudien unter Hypoxie soll speziell die Rolle des *Cx31* Gens, das für die Differenzierung der Trophoblastzelllinie von Bedeutung ist, definiert werden.

#### 3.1.1 Wildtyp Trophoblast-Stammzellen

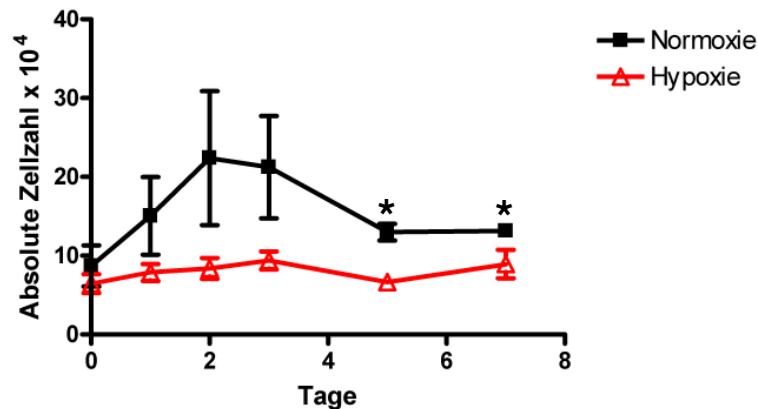
##### 3.1.1.1 Proliferationsverhalten der WT TS-Zelllinien unter Hypoxie

TS-Zellen erhalten ihren Stammzellcharakter durch Inkubation in von Fibroblasten konditioniertem Medium unter Zusatz von FGF4 und Heparin. Bei Entzug dieser Faktoren - im sogenannten Differenzierungsmedium - differenzieren sie entlang der Trophoblastzelllinie. Um einen eventuellen Einfluss von Hypoxie auf das Proliferationsverhalten von WT TS-Zellen zu untersuchen, wurden diese über einen Zeitraum von 7 Tagen in Stammzellmedium bzw. im differenzierenden Medium unter hypoxischen Bedingungen kultiviert. Der Vergleichansatz wurde unter normoxischen Bedingungen inkubiert. Die Gesamtzellzahl der Kultur wurde an Tag 0, d.h. unter Stammzellbedingungen, sowie an den Tagen 1, 2, 3, 5 und 7 unter differenzierenden Bedingungen ermittelt. Für jeden Tag wurde eine Dreifachbestimmung eines Klons durchgeführt und die Zellzahl der drei verschiedenen Klone gemittelt.

Die WT TS-Zellen, die unter Normoxie kultiviert worden sind, zeigten bis zum Tag 2 der Differenzierung eine Zunahme der Gesamtzellzahl (Abb. 3.1). Anschließend nahm bis zum Tag 7 der Differenzierung die Gesamtzellzahl wieder kontinuierlich ab, da die Zellkultur über eine stationäre Phase in die Absterbephase übergegangen war. Im Gegensatz dazu zeigten die Zellen, die unter Hypoxie kultiviert worden waren, direkt vom Beginn der Messungen an ein reduziertes Proliferationsverhalten, welches an den Tagen 5 und 7 statistisch signifikant

reduziert war. Über den gesamten Differenzierungszeitraum konnte keine Erhöhung der Zellzahl der TS-Zellen detektiert werden.

Diese Versuchsreihe verdeutlicht also, dass die Zellen, die unter Hypoxie kultiviert worden sind, ein reduziertes Proliferationspotential und somit eine geringere Zellzahl aufwiesen.

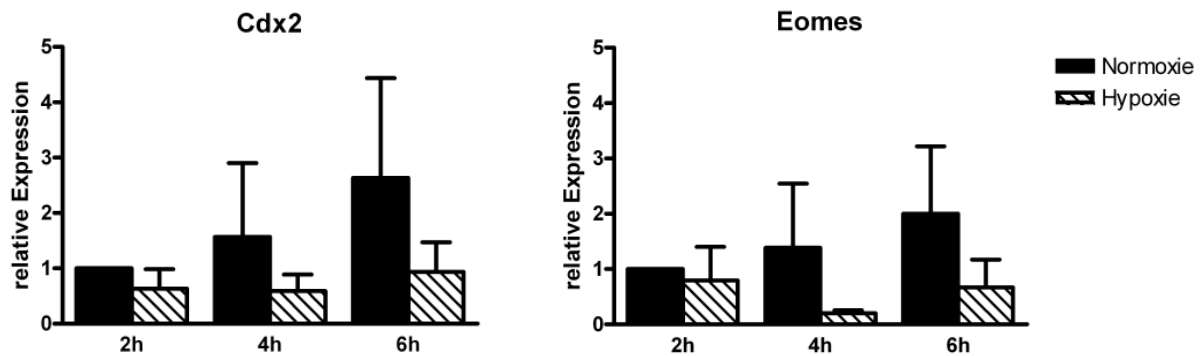


**Abb. 3.1 Proliferation von WT TS-Zelllinien unter Hypoxie.** Dargestellt ist die gemessene absolute Zellzahl der proliferierenden TS-Zelllinien im undifferenzierten Zustand (Tag 0) sowie unter differenzierenden Bedingungen. Für die Zellen, die unter Hypoxie kultiviert worden sind und für die Zellen, die unter Normoxie kultiviert worden sind, wurden jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet. Zellzahlen, die an einzelnen Tagen signifikant voneinander abweichen, sind gekennzeichnet (\* $\leq 0.05$ ).

### 3.1.1.2 Der Einfluss von Hypoxie auf undifferenzierte TS-Zellen

Das Proliferationsvermögen geht eng mit der Erhaltung des Stammzellpotentials bzw. des Gehaltes an undifferenzierten Zellen einher. Aus diesem Grunde wurden die frühen Stammzellmarker *Cdx2* und *Eomes*, die für die Entwicklung der frühen Trophoblastzelllinie essentiell sind (Chawengsaksophak et al., 1997; Russ et al., 2000), analysiert. Dafür wurden die Zellen im undifferenzierten Zustand für 2h, 4h und 6h unter Hypoxie kultiviert, während der Kontrollansatz weiterhin unter normoxischen Bedingungen inkubiert worden ist.

Während der Kultivierungszeit (2h-6h) stiegen die Expressionslevel der Stammzellmarker *Eomes* und *Cdx2* in den Zellen, die unter normoxischen Bedingungen gehalten wurden, geringfügig an (Abb. 3.2). Die WT TS-Zellen, die unter hypoxischen Bedingungen inkubiert wurden, zeigten nach 2h Inkubation eine ähnlich starke Expression von *Cdx2* und *Eomes*, jedoch konnte hier keine Steigerung beobachtet werden. Dieses verdeutlicht, dass das Stammzellpotential in der normoxischen Kultur im Verlauf des Kultivierungszeitraumes erhöht wurde, während das Stammzellpotential in der hypoxischen Kultur kontinuierlich geringer blieb. Unter Hypoxie wiesen die Zellen neben einer reduzierten Proliferationsrate also auch ein geringeres Stammzellpotential auf.



**Abb. 3.2 Die Expressionen der Stammzellmarker *Cdx2* und *Eomes* unter Stammzellbedingungen in WT TS-Zellen.** Real-Time-PCR Ergebnisse der WT TS-Zellen, die unter undifferenzierenden Bedingungen unter Normoxie oder Hypoxie kultiviert worden sind. Angegeben ist der Mittelwert aus drei unabhängigen Messungen, die gegen das entsprechende  $\beta$ -Aktin Signal abgeglichen worden sind, und die Standardabweichung.

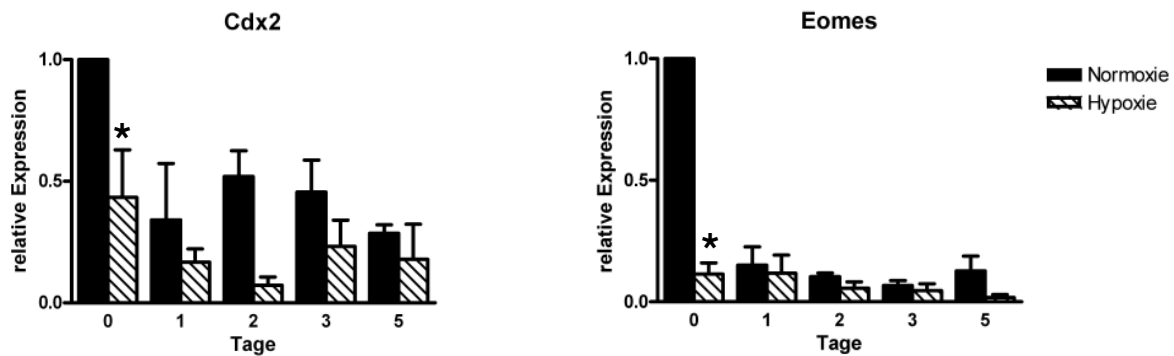
### 3.1.1.3 Der Einfluss von Hypoxie auf das Differenzierungsverhalten von TS-Zellen

Um den Einfluss von Hypoxie auf das Differenzierungsverhalten von WT TS-Zellen unter differenzierenden Bedingungen näher zu untersuchen, wurden die Zellen in Stammzellmedium ausplattiert und nach 24h geerntet (Tag 0) oder für eine weitere Kultivierung in differenzierendem Medium überführt und nach einem Tag bzw. 2, 3, und 5 Tagen geerntet. Aus den Zellen wurde die RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und die Expressionsstärken der spezifischen Gene mit Hilfe der jeweiligen Primern mittels Real-Time-PCR analysiert.

#### 3.1.1.3.1 Stammzellmarker *Cdx2* und *Eomes*

Unter normoxischen Bedingungen nahm die Expression von *Cdx2* und *Eomes* über den Differenzierungszeitraum kontinuierlich ab, was auf einen Verlust des Stammzellpotentials und somit auf eine verstärkte Differenzierung der Zellen hindeutet (Abb. 3.3).

Unter hypoxischen Bedingungen konnte bereits in den undifferenzierten Zellen (an Tag 0) eine signifikante Reduzierung der Expressionsstärke der beiden Transkriptionsfaktoren beobachtet werden. Dieses korreliert mit den Ergebnissen zur Untersuchung des Einflusses von Hypoxie unter Stammzellbedingungen, wo ebenfalls in den hypoxisch inkubierten Zellen eine generelle schwächere Expression der beiden Stammzellmarker festgestellt werden konnte (Abb. 3.2). Die hypoxisch inkubierten Zellen zeigten somit ein geringeres Stammzell-/Proliferationspotential, was ein Hinweis darauf ist, dass die Zellen möglicherweise früher in die Differenzierung eintreten.



**Abb. 3.3:** Die Expressionen der frühen Stammzellmarker *Cdx2* und *Eomes* während der Differenzierung von WT TS-Zellen unter normoxischen als auch unter hypoxischen Bedingungen. Dargestellt sind die Real-Time-PCR Ergebnisse von drei verschiedenen WT TS-Zellklonen. Angegeben sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen der verschiedenen Messungen, die gegen das entsprechende  $\beta$ -Aktin-Signal abgeglichen worden sind. Signifikant unterschiedliche Werte sind gekennzeichnet (\* $\leq 0.05$ ).

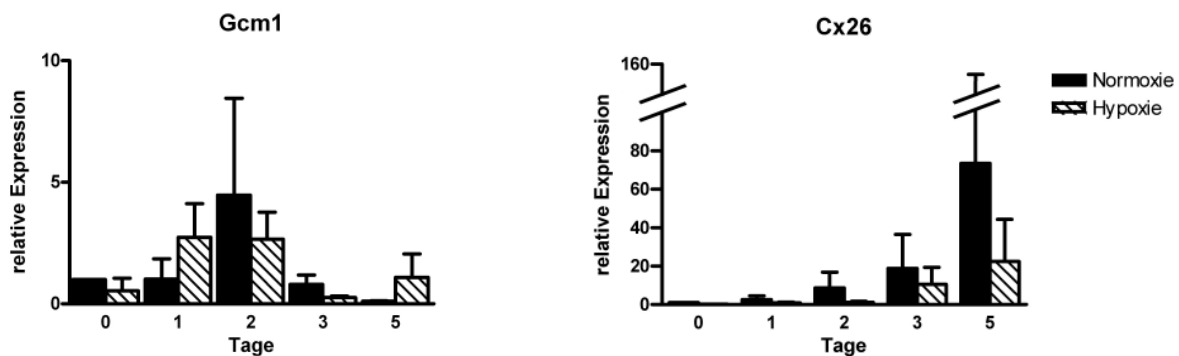
### 3.1.1.3.2 Labyrinthmarker *Gcm1* und *Cx26*

*Gcm1* und *Cx26* sind beide Marker für den labyrinthären Synzytiotrophoblasten (Anson-Cartwright et al., 2000; Gabriel et al., 1998). *Gcm1* charakterisiert die Trophoblastzellen, die während der Einfaltung des Chorionektoderms und der Einsprossung des allantoischen Mesoderms elongieren und zum Synzytiotrophoblasten fusionieren (Anson-Cartwright et al., 2000). *Cx26* ist etwas später in der Plazentaentwicklung im sich ausdifferenzierenden Labyrinth lokalisiert, wo es den feto-maternalen Glukosetransport über die beiden Schichten des Synzytiotrophoblasten vermittelt (Gabriel et al., 1998).

Die *Gcm1* Expression stieg unter Normoxie bis zum Tag 2 an und nahm dann innerhalb des Differenzierungszeitraumes kontinuierlich wieder ab (Abb. 3.4). Unter hypoxischen Bedingungen erfolgte ein sehr ähnlicher Expressionsverlauf, nur wurde hier an den Tagen 0, 2 und 3 eine etwas geringfügig reduzierte Expression beobachtet.

Die *Cx26* Expression nahm konstant über den Differenzierungszeitraum bis zum Tag 5, an dem das Expressionsmaximum erreicht wurde, zu. Diesen Verlauf konnte bereits Kibschull et al. (2004) zeigen. Auch hier begann die *Cx26* Expression an Tag 1 des Differenzierungszeitraumes und stieg dann bis zum Tag 9 kontinuierlich an. Unter hypoxischen Bedingungen konnte ebenfalls ein Anstieg der *Cx26* Expression über den Differenzierungszeitraum beobachtet werden. Im Vergleich zum Expressionslevel unter Normoxie war die Expression jedoch deutlich geringer. So konnte an Tag 3 nur eine relative Expression von 10.41 ermittelt werden, während unter normoxischen Bedingungen eine fast doppelt so hohe relative Expression von 18.8 beobachtet werden konnte. An Tag 5 wurde

unter normoxischen Bedingungen ein Maximum der relativen Expression mit 73.4 ermittelt, wogegen die hypoxische Probe nur 22.4 aufwies.



**Abb. 3.4:** Die Expressionen der labyrinthären Marker *Gcm1* und *Cx26* während der Differenzierung von WT TS-Zellen unter normoxischen als auch unter hypoxischen Bedingungen. Dargestellt sind die Real-Time-PCR Ergebnisse von drei verschiedenen WT TS-Zellklonen. Angegeben sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen der verschiedenen Messungen, die gegen das entsprechende  $\beta$ -Aktin-Signal abgeglichen worden sind.

Hypoxie hat keinen statistisch signifikanten Einfluss auf das Expressionsprofil der Labyrinthmarker. Aufgrund der reduzierten Expressionen von *Gcm1* und *Cx26* kann jedoch auf eine verringerte Ausbildung des labyrinthären Trophoblasten unter hypoxischen Bedingungen geschlossen werden.

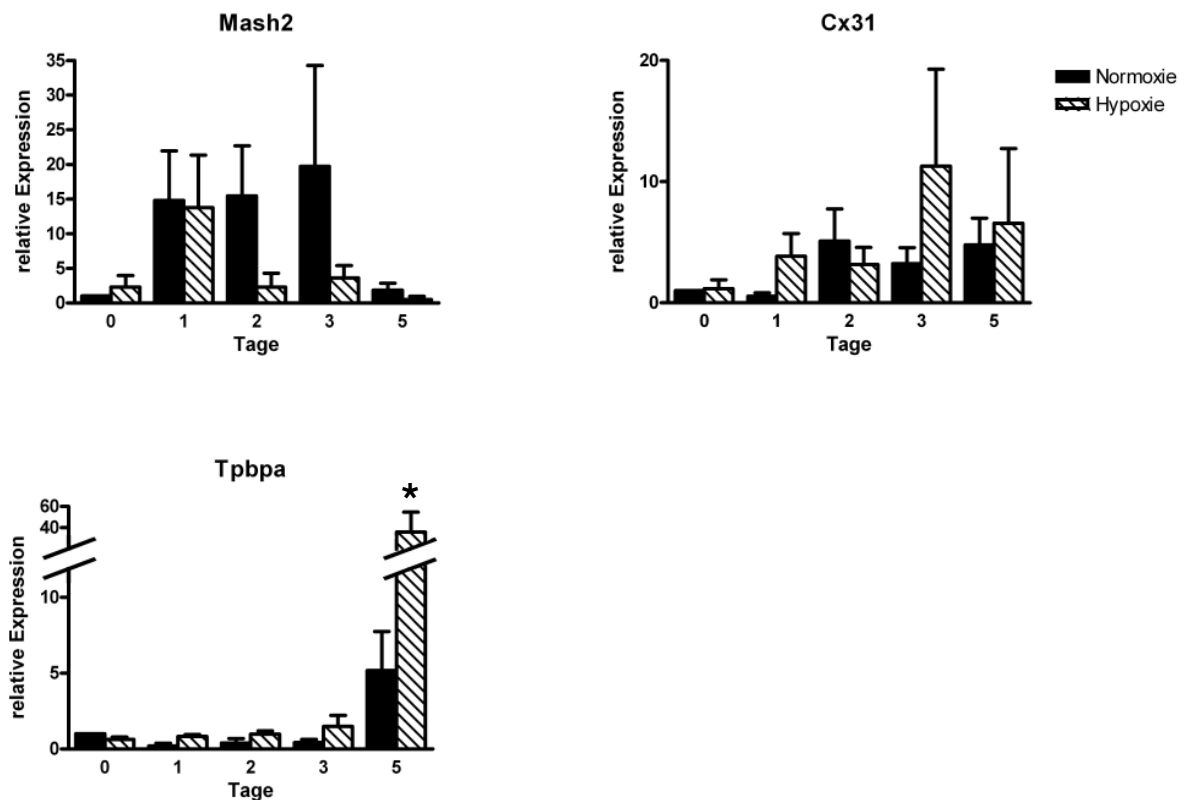
### 3.1.1.3.3 Spongiotrophoblastmarker *Mash2*, *Cx31* und *Tpbpa*

Der basic helix-loop-helix Transkriptionsfaktor *Mash2* wird in den diploiden Trophoblasten im Chorion, Ektoplazentarkonus und später im Spongiotrophoblasten exprimiert. Hierbei fördert *Mash2* die transiente FGF4 - unabhängige Proliferation der Trophoblastzellen, die sich zum Spongiotrophoblasten und zu den Trophoblast-Riesenzellen ausdifferenzieren (Hughes et al., 2004). Unter normoxischen Bedingungen wurde die *Mash2*-Expression an Tag 1 induziert und zeigte dann bis zum Tag 3 eine gleichbleibende Expression, die an Tag 5 wieder stark abnahm (Abb. 3.5). Damit wurde der von Kibschull et al. (2004) unter Normoxie beobachtete *Mash2*-Verlauf bestätigt. Unter hypoxischen Bedingungen konnte dagegen nur am Tag 1 eine starke *Mash2*-Expression beobachtet werden, während an den späteren Tagen nur noch geringfügige Expressionen nachgewiesen werden konnten. Diese frühe Runterregulierung der *Mash2* Expression verdeutlicht, dass die Zellen ihr Stammzellpotential vermutlich eher verlieren und somit früher in die Differenzierung entlang des Spongiotrophoblasten und der Trophoblast-Riesenzellen eintreten.

Einen Tag später als *Mash2* wurde unter normoxischen Bedingungen die Induktion der *Cx31*- Expression beobachtet, die anschließend bis zum Ende des Differenzierungsraumes relativ konstant blieb (Abb. 3.5). Unter hypoxischen Bedingungen konnte an Tag 1, 3 und 5

eine höhere Menge an *Cx31* Transkripten beobachtet werden. Da in der Plazenta der Maus der Spongiotrophoblast als Derivat des Ekto-plazentarkonus die anhaltende Expression von *Cx31* zeigt (Plum et al., 2001), weist diese erhöhte Transkriptmenge unter Hypoxie auf eine Förderung der Differenzierung zur Spongiotrophoblasten-Zelllinie hin.

Auch das Expressionsprofil von *Tpbpa* weist auf eine Förderung der Differenzierung zur Spongiotrophoblasten-Zelllinie durch die Hypoxie bedingt hin. In den Zellkulturen unter Hypoxie konnte ab dem 1. Tag des Differenzierungszeitraumes im Vergleich zu den normoxischen Proben generell eine höhere Expression beobachtet werden (Abb. 3.5). Am Tag 5 zeigten die hypoxisch inkubierten Zellen sogar eine 7fach höhere Transkriptmenge an *Tpbpa* und somit einen signifikanten Unterschied zu den normoxisch inkubierten Zellen.



**Abb. 3.5 Die Expressionen der Spongiotrophoblastmarker *Mash2*, *Cx31* und *Tpbpa* während der Differenzierung von WT TS-Zellen unter normoxischen als auch unter hypoxischen Bedingungen.** Dargestellt sind die Real-Time-PCR Ergebnisse von drei verschiedenen WT TS-Zellklonen. Angegeben sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen der verschiedenen Messungen, die gegen das entsprechende  $\beta$ -Aktin-Signal abgeglichen worden sind. Signifikant unterschiedliche Werte sind gekennzeichnet (\* $\leq 0.05$ ).



### 3.1.1.3.4 Trophoblast-Riesenzellmarker *AP-2 $\gamma$* und *PI-1*

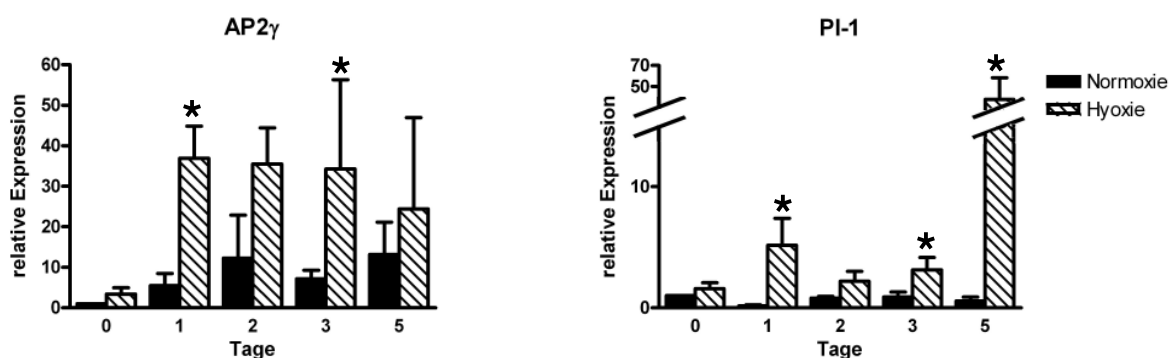
Die Expression von *Ap-2 $\gamma$*  erscheint in der murinen Entwicklung erstmal mit Beginn der Trophoblastdifferenzierung und bleibt bei fortschreitender Plazentaentwicklung in allen Zellen der Trophoblastlinie bestehen (Shi and Kellems, 1998; Sapin et al., 2000).

*Ap-2 $\gamma$*  Transkripte wurden über den gesamten Differenzierungszeitraum in den TS-Zellen, welche unter normoxischen Bedingungen kultiviert worden sind, detektiert (Abb. 3.6). Dabei konnte man einen leichten Expressionsanstieg an Tag 2 beobachten, wonach die Expression nahezu auf dem gleichen Level blieb. Unter hypoxischen Bedingungen konnte schon unter proliferierenden Bedingungen (Tag 0) eine leicht erhöhte *AP-2 $\gamma$*  Expression verzeichnet werden, die dann unter differenzierenden Bedingungen (ab Tag 1) stark anstieg und im Vergleich zu den normoxischen Kulturen an den Tagen 1 und 3 signifikant erhöht war.

Ebenfalls ist unter hypoxischen Bedingungen eine größere Menge an Placental lactogen I (PI-I) - ein spezifisches Hormon der Trophoblast-Riesenzellen- in den WT TS-Zellen erfasst worden (Abb. 3.6). Signifikante Erhöhungen der *PI-1* Transkripte konnten an den Tagen 1 und 3 - wie beim *AP-2 $\gamma$*  Expressionprofil - und am Tag 5 - wie beim *Tpbpa*-Expressionprofil - aufgenommen werden.

Unter normoxischen Bedingungen konnte im allgemeinen nur eine sehr geringe *PI-1* Expression beobachtet werden, was mit den Ergebnissen von Kibschull et al. (2004) korreliert. Kibschull et al. (2004) konnten erst ab Tag 7 eine *PI-1*-Expression nachweisen, die dann aber bis zum Ende des Differenzierungszeitraumes (Tag 13) kontinuierlich anstieg.

Da Öztürk et al. (2006) eine Rolle für *AP-2 $\gamma$*  bei der Expression von Placental lactogen II - ebenfalls spezifisch für die Trophoblast-Riesenzellen - bei der Ratte nachweisen konnte, lassen die erhöhten Expressionen von *AP-2 $\gamma$*  und *PI-1* vermuten, dass Hypoxie die Ausbildung von Trophoblast-Riesenzellen fördert.



**Abb. 3.6** Die Expressionen der Trophoblastriesenzellmarker *AP-2 $\gamma$*  und *PI-1* während der Differenzierung von WT TS-Zellen unter normoxischen als auch unter hypoxischen Bedingungen. Ermittlung der Werte wie unter Abb.3.5 beschrieben.

#### **3.1.1.4 Morphologische Analyse der Trophoblast-Riesenzellen**

In den vorherigen Expressionsanalysen konnte gezeigt werden, dass eine Inkubation von WT TS-Zellen unter hypoxischen Bedingungen zu einer verstärkten Differenzierung zu den Trophoblast-Riesenzellen führt. Es wurde nun getestet, ob die auf mRNA Ebene gefundenen Ergebnisse auch morphologisch nachvollzogen werden konnten.

##### **3.1.1.4.1 Auszählung der Trophoblast-Riesenzellen**

Es wurde die Anzahl der Trophoblast-Riesenzellen im Vergleich zu der Gesamtzellzahl der Kultur mit Hilfe des Programms Lucia Image Software (Nikon) ermittelt. Dazu wurden WT TS-Zellen, die 24h in proliferativem Medium unter normoxischen als auch hypoxischen Bedingungen inkubiert worden sind (Tag 0), für weitere 7 Tage in die Differenzierung geschickt.

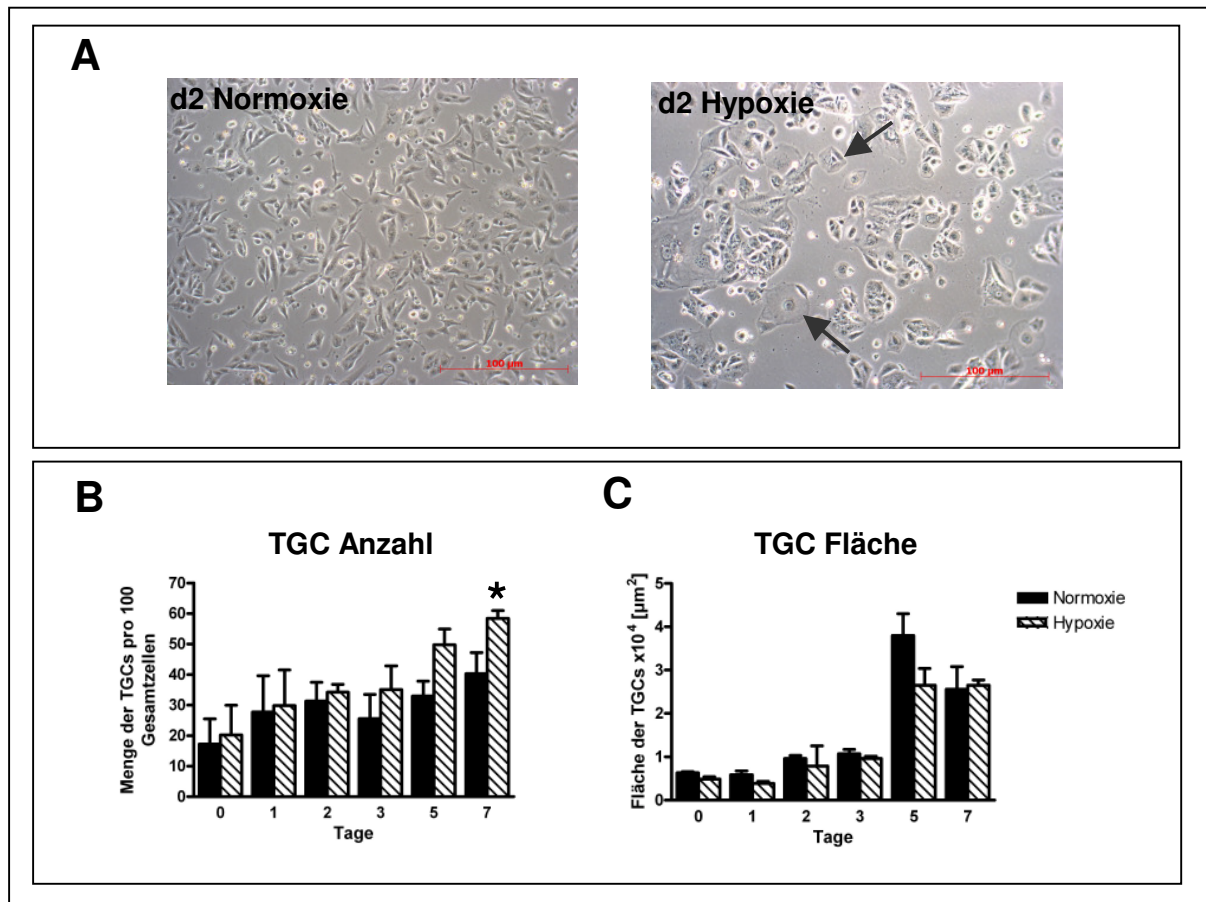
Am Anfang der Kulturperiode konnte in den beiden unterschiedlich inkubierten Zellkulturen noch eine ähnliche Anzahl an TGCs beobachtet werden (Abb. 3.7 B). Ab dem 5.Tag zeigten die hypoxisch inkubierten Zellen jedoch einen deutlich erhöhten TGC-Anteil. So waren bereits die Hälfte aller TS-Zellen zu Riesenzellen ausdifferenziert, während unter normoxischen Bedingungen weniger als 1/3 der Zellen zu TGCs differenziert waren.

An Tag 7 des Differenzierungszeitraumes konnte ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Kulturen beobachtet werden. So wies die normoxische Kultur 40,3 TGCs/pro 100 Gesamtzellzahl auf, während in der hypoxischen Kultur 58,4 TGCs/pro 100 Gesamtzellzahl ermittelt werden konnte.

##### **3.1.1.4.2 Ermittlung der Zelloberfläche der Trophoblast-Riesenzellen**

Ob die erhöhte Anzahl der Trophoblast-Riesenzellen mit einer Vergrößerung der Zelloberfläche einhergeht, wurde ebenfalls mit der Lucia Image Software von Nikon untersucht.

Es wurde beobachtet, dass in den ersten drei Kulturtagen eine leichte Vergrößerung der Zellfläche von ca.  $0,5 \times 10^4 \mu\text{m}^2$  zu ca.  $1 \times 10^4 \mu\text{m}^2$  stattgefunden hat (Abb. 3.7 C). Einen starken Anstieg der Zelloberfläche konnte man zwischen den Tagen 3 und 5 beobachten. Hier verdreifachte sich das Zellvolumen von ca.  $1 \times 10^4 \mu\text{m}^2$  auf ca.  $3 \times 10^4 \mu\text{m}^2$ . Dabei konnte jedoch kein Unterschied zwischen den Kulturen, die unter normoxischen oder hypoxischen Bedingungen kultiviert worden sind, beobachtet werden. Hypoxie fördert somit die Anzahl der Riesenzellen, beeinflusst aber nicht die Größe der TGC-Zelloberfläche.

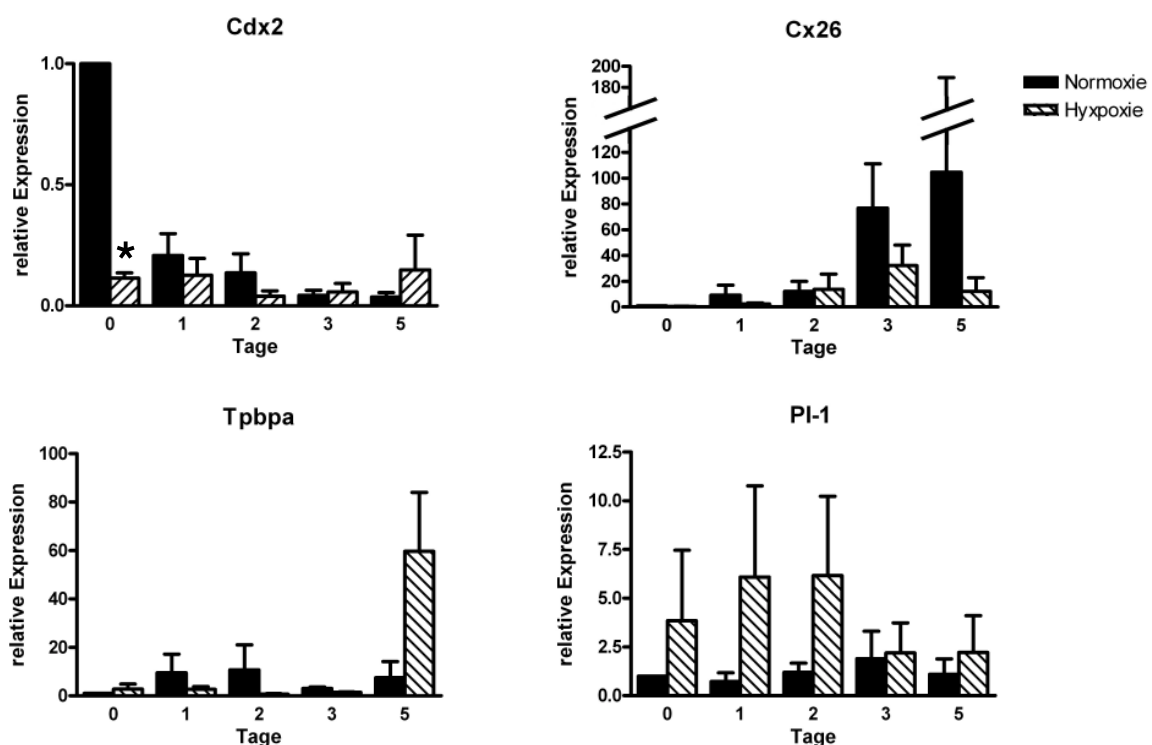


**Abb. 3.7 Morphologische Analyse der Trophoblast-Riesenzellen.** **A:** Phasenkontrastaufnahmen zeigen WT TS-Zellen, die für 2 Tage in differenzierendem Medium unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen inkubiert worden sind. Trophoblast-Riesenzellen sind durch Pfeile gekennzeichnet. Balken: 100  $\mu\text{m}$ . **B+C:** Die ermittelte Anzahl und Fläche der TGCs. Es wurden WT TS-Zellen für 7 Tage unter normoxischen und hypoxischen Konditionen ausdifferenziert. Werte, die an einzelnen Tagen signifikant voneinander abweichen, sind gekennzeichnet (\* $\leq 0.05$ ).

### 3.1.1.5 Der Einfluss von Hypoxie auf das Differenzierungsverhalten der TS-Zellen unter verschiedenen Kultivierungsbedingungen

In den vorausgegangenen Expressionsstudien wurden die WT TS-Zellen nach dem Auftauen unter normoxischen Bedingungen im Stammzellmedium kultiviert. Als eine entsprechende Zellzahl erreicht worden ist, wurden die Zellen ausplattiert und in eine hypoxische Umgebung überführt. Der Kontrollansatz wurde weiterhin unter normoxischen Bedingungen kultiviert. Um ausschließen zu können, dass die anfängliche Inkubation der Zellen unter Normoxie einen Einfluss auf das Differenzierungsverhalten der TS-Zellen besitzt, wurde ein zweiter Inkubationsansatz gestartet. Dazu wurden die Zellen nach dem Auftauen direkt unter hypoxischen Bedingungen im Stammzellmedium bis zum Erreichen der entsprechenden Zellzahl kultiviert. Anschließend wurden die Zellen dieses Versuchansatzes und die Zellen des Kontrollansatzes, der auch hier von Anfang an unter normoxischen Bedingungen kultiviert worden ist, im Stammzellmedium ausplattiert. Die Zellen wurden nach 24h

Inkubation (Tag 0) geerntet oder in Differenzierungsmedium überführt und an den Tagen 1, 2, 3 und 5 geerntet. Wie Abb. 3.8 zeigt, wies auch hier der Stammzellmarker *Cdx2* bereits im undifferenzierten Zustand unter Hypoxie ein reduziertes Expressionslevel auf, welches in den normoxischen Kulturen erst im Laufe der Differenzierung erreicht wurde. Auch die Expression des labyrinthären Markers *Cx26* war unter hypoxischen Bedingungen geringer als unter Normoxie, was ebenfalls auf eine reduzierte Ausbildung des labyrinthären Trophoblasten hinweist (s. Abb. 3.4). Dagegen war die Expression des Spongiotrophoblast-markers *Tpbpa* ab Tag 5 und die Expression des Trophoblast-Riesenzellmarker *Pl-1* bereits ab Tag 0 unter Hypoxie erhöht.



**Abb. 3.8: Einfluss der Kultivierungsbedingung auf das Differenzierungsverhalten der WT TS-Zellen.** WT TS-Zellen sind direkt nach dem Auftauen unter Hypoxie im Stammzellmedium kultiviert worden. Beim Erreichen der nötigen Zellzahl wurden die Zellen unter Stammzellbedingungen ausplattiert und nach 24h geerntet oder in Differenzierungsmedium überführt und nach 1, 2, 3 oder 5 Tagen geerntet. Der Kontrollansatz wurde nach dem Auftauen parallel unter normoxischen Bedingungen kultiviert. Die aufgearbeitete mRNA wurde mittels Real-Time-PCR analysiert. Angegeben sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen von drei unabhängigen Messungen, die gegen das entsprechende  $\beta$ -Aktin-Signal abgeglichen worden sind. Signifikant unterschiedliche Werte sind gekennzeichnet (\* $\leq 0.05$ ).

Diese Kultivierungsart führt also auch zu einer verstärkten Differenzierung in Richtung der Spongiotrophoblastzelllinie und der Trophoblast-Riesenzellen. Dieses sind vergleichbare Resultate mit den Ergebnissen aus den vorausgegangenen Expressionsstudien, wo die

Zellen erst anfänglich unter normoxischen Bedingungen kultiviert und nur für den Zeitraum der Differenzierung in eine hypoxische Umgebung überführt worden sind.

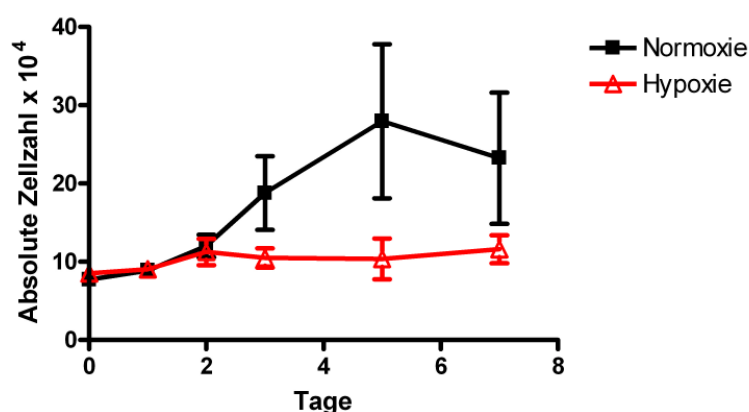
### 3.1.2 Cx31 defiziente Trophoblast-Stammzellen

Anhand generierter Cx31 defizienter TS-Zelllinien (Kibschull et al., 2004) konnte mittels spezifischer Marker gezeigt werden, dass der Verlust des Cx31 Kanals zu einer früheren und verstärkten Differenzierung in Richtung der Trophoblast-Riesenzellen führt, welches mit einer reduzierten Proliferation verbunden ist. Dieser Phänotyp der Cx31 defizienten TS-Zellen ähnelt sehr stark dem Verhalten der WT TS-Zellen, die unter Hypoxie kultiviert worden sind. Denn auch hier konnte eine frühe Differenzierung in Richtung Trophoblast-Riesenzellen beobachtet werden, die mit einem Verlust des Stammzell- und Proliferationspotentials einherging.

Es sollte nun untersucht werden, ob der Phänotyp der Cx31 defizienten TS-Zellen durch Inkubation unter hypoxischen Bedingungen noch verstärkt werden kann, oder ob sogar synergistische Effekte vorliegen.

#### 3.1.2.1 Proliferationsverhalten der Cx31 defizienten Trophoblast-Stammzellen unter Hypoxie

Um den Einfluss der Hypoxie auf das Proliferationsverhalten von Cx31 defizienten TS-Zellen zu untersuchen, wurden Cx31<sup>-/-</sup> TS-Zellen 24h unter undifferenzierenden Bedingungen kultiviert und anschließend für weitere 7 Tage in differenzierendem Medium sowohl unter normoxischen als auch hypoxischen Bedingungen inkubiert.



**Abb. 3.9 Proliferation von Cx31<sup>-/-</sup> TS-Zelllinien unter Hypoxie.** Dargestellt ist die gemessene absolute Zellzahl der proliferierenden TS-Zelllinien in undifferenziertem Zustand (Tag 0), sowie unter differenzierenden Bedingungen. Es wurden jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet.

Kibschull et al. (2004) konnte für die *Cx31*<sup>-/-</sup> TS-Zellen unter normoxischen Bedingungen ein reduziertes Proliferationsverhalten beobachten. Hier konnte jedoch kein reduziertes, sondern nur ein verzögertes Wachstumsverhalten verzeichnet werden (Abb. 3.9). So wurde hier das Maximum der Proliferation an Tag 5 erreicht - 3 Tage später als die WT TS-Zellen, die unter Normoxie inkubiert worden sind. Die erreichte absolute Zellzahl ist in beiden Kulturen jedoch sehr ähnlich.

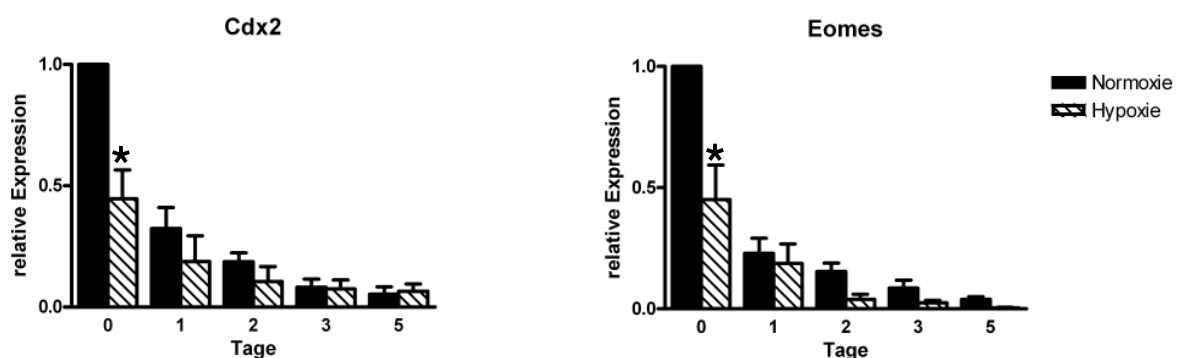
Die *Cx31*<sup>-/-</sup> TS-Zellen, die unter Hypoxie kultiviert wurden, zeigten im Vergleich zu den normoxisch inkubierten *Cx31*<sup>-/-</sup> TS-Zellen ein stark reduziertes Proliferationsverhalten. Da dieses auch bei den WT TS-Zellen beobachtet werden konnte, führt Hypoxie also generell zu einer Reduktion des Proliferationsvermögens einer TS-Zellkultur. Diese Reduktion des Proliferationspotentials kann aber nicht zusätzlich durch den Verlust des Cx31 Kanals gesteigert werden.

### 3.1.2.2 Der Einfluss von Hypoxie auf das Differenzierungsverhalten von *Cx31*<sup>-/-</sup> TS-Zellen

Wie sich die Hypoxie nun im Detail auf das Differenzierungsverhalten von *Cx31* defizienten TS-Zellen auswirkt, wurde auch hier mittels der spezifischen Marker für die TS-Zellliniendifferenzierung untersucht. Dazu wurden die Zellen ebenfalls in Stammzellmedium ausplattiert und nach 24h geerntet (Tag 0) oder für eine weitere Kultivierung in differenzierendes Medium überführt. Die Ernte erfolgte an den Tagen 1, 2, 3, und 5.

#### 3.1.2.2.1 Stammzellmarker *Cdx2* und *Eomes*

Die Expressionen der frühen Stammzellmarker *Cdx2* und *Eomes* wurde während des Differenzierungszeitraumes von 5 Tagen in *Cx31*<sup>-/-</sup> TS-Zelllinien analysiert (Abb. 3.10).



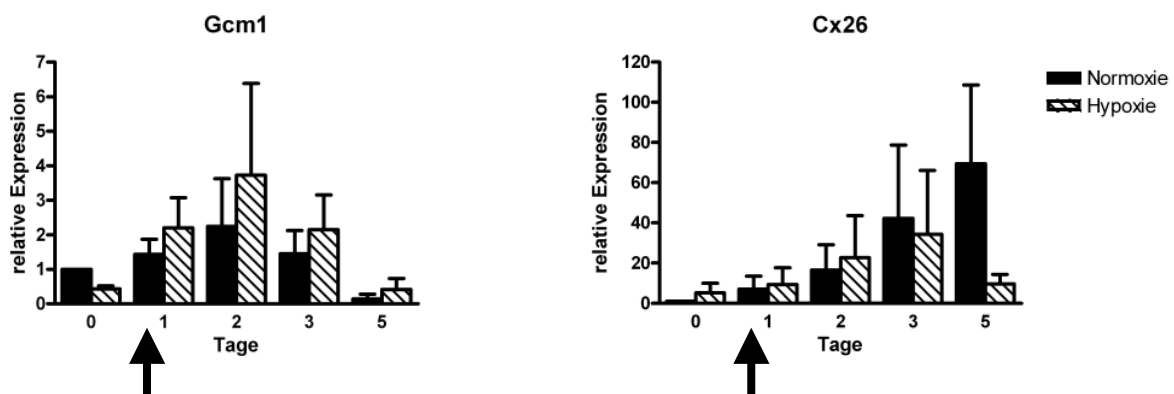
**Abb. 3.10:** Die Expressionen der Stammzellmarker *Cdx2* und *Eomes* während der Differenzierung von *Cx31*<sup>-/-</sup> TS-Zellen unter normoxischen als auch unter hypoxischen Bedingungen. Ermittlung der Werte wie unter Abb.3.5 beschrieben.

Die *Cx31*<sup>-/-</sup> TS-Zellen, die unter Normoxie und Hypoxie kultiviert worden sind, zeigten das gleiche *Cdx2*- und *Eomes* - Expressionsprofil wie die WT TS-Zelllinien. In den normoxischen Kulturen wurde ebenfalls im undifferenzierten Zustand hohe *Cdx2*- und *Eomes*-Transkripte beobachtet, die im Laufe der Differenzierung kontinuierlich abnahmen. Die *Cx31*<sup>-/-</sup> TS-Zellen, die unter Hypoxie kultiviert worden sind, zeigten auch hier bereits im undifferenzierten Zustand eine signifikante Verringerung der Transkripte.

Das Expressionprofil der Stammzellmarker *Cdx2* und *Eomes* ist also unabhängig vom Cx31 Kanal und eine hypoxische Inkubation wirkt generell mit einer Reduktion des Stammzellpotentials.

### 3.1.2.2.2 Labyrinthmarker *Gcm1* und *Cx26*

Der Expressionsverlauf der Marker *Gcm1* und *Cx26* in normoxisch und hypoxisch inkubierten *Cx31*<sup>-/-</sup> TS-Zellen ist vergleichbar mit dem Expressionsprofil der labyrinthären Markern in WT TS-Zellen.



**Abb. 3.11: Die Expressionen der labyrinthären Marker *Gcm1* und *Cx26* während der Differenzierung von *Cx31*<sup>-/-</sup> TS-Zellen unter normoxischen als auch unter hypoxischen Bedingungen.** Ermittlung der Werte wie unter Abb.3.5 beschrieben. Pfeile verdeutlichen die frühere stärkere Induktion der untersuchten Marker in den *Cx31*<sup>-/-</sup> TS-Zellen vergleichend zu den WT TS-Zellen (vergl. Abb. 3.4).

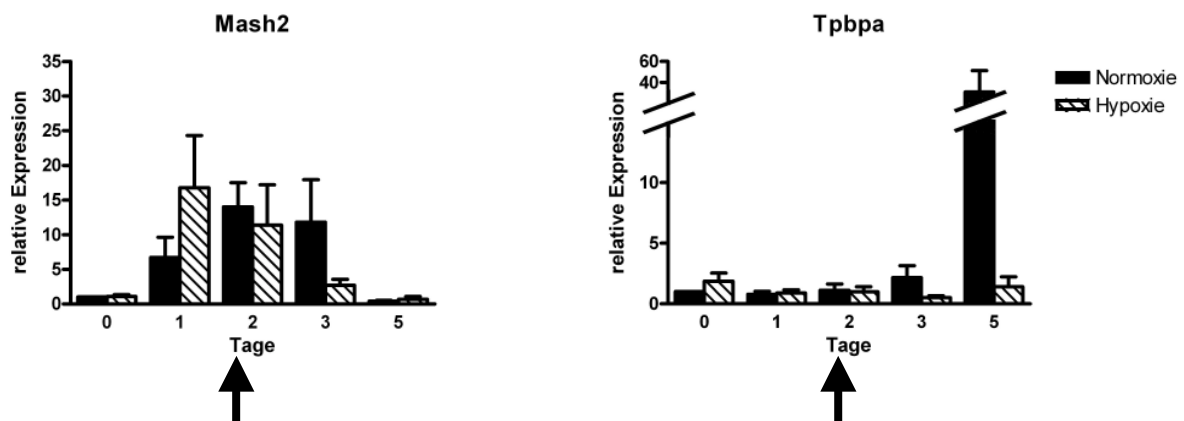
So konnte unter normoxischen Bedingungen ebenfalls ein Expressionsanstieg von *Gcm1* innerhalb der ersten zwei Tage beobachtet werden, während die *Cx26* Expression kontinuierlich über den gesamten Differenzierungszeitraum zunahm (Abb. 3.11). Die *Cx31*<sup>-/-</sup> TS-Zellen zeigten im Vergleich zu den WT TS-Zellen jedoch eine frühere stärkere Expression von *Gcm1* und von *Cx26* (Pfeil). Dieses verdeutlicht die eher eintretende Differenzierung der *Cx31* defizienten TS-Zellen in die labyrinthären TS-Zellen.

Die hypoxischen Kulturen zeigten auch hier im Vergleich zu den normoxischen Kulturen keinen signifikanten Unterschied - eine Reduktion der *Cx26* - Expression konnte jedoch an den Tagen 3 und 5 nachvollzogen werden.



### 3.1.2.2.3 Sphingiotrophoblastmarker *Mash2* und *Tpbpa*

Unter normoxischen Bedingungen wird am Tag 2 das Expressionsmaximum von *Mash2* - den Marker für die Vorstufe des Sphingiotrophoblasten - in *Cx31*<sup>-/-</sup> TS-Zellen erreicht (Abb. 3.12). Aufgrund der verstärkten Differenzierung der *Cx31* defizienten TS-Zellen erfolgte dieses 1 Tag früher als bei WT TS-Zellen (Pfeil).



**Abb. 3.12: Die Expressionen der Sphingiotrophoblastmarker *Mash2* und *Tpbpa* während der Differenzierung von *Cx31*<sup>-/-</sup> TS-Zellen unter normoxischen als auch unter hypoxischen Bedingungen.** Ermittlung der Werte wie unter Abb.3.5 beschrieben. Pfeile verdeutlichen die frühere stärkere Induktion der untersuchten Marker in den *Cx31*<sup>-/-</sup> TS-Zellen vergleichend zu den WT TS-Zellen (vergl. Abb. 3.5).

Hypoxie führte in den *Cx31* defizienten TS-Zellen zu einer früheren Reduktion von *Mash2*, was vergleichbar mit dem Verhalten der WT TS-Zellen unter hypoxischen Bedingungen ist. So konnte aber auch hier kein synergistischer Effekt von Hypoxie und dem Verlust von dem *Cx31* Kanal beobachtet werden.

Der Sphingiotrophoblastmarker *Tpbpa* zeigte ebenfalls unter normoxischen Bedingungen die frühere stärkere Induktion in *Cx31* defizienten TS-Zellen (Pfeil). Interessanterweise konnte jedoch unter Hypoxie keine verstärkte Bildung des Sphingiotrophoblasten bei den *Cx31* defizienten TS-Zellen mehr verzeichnet werden (Abb. 3.12). Das Expressionslevel blieb ab dem undifferenzierten Zustand (Tag 0) ungefähr auf dem gleichen Level, während in WT TS-Zellen ab Tag 5 eine signifikante Erhöhung der Expression durch Hypoxie beobachtet werden konnte.

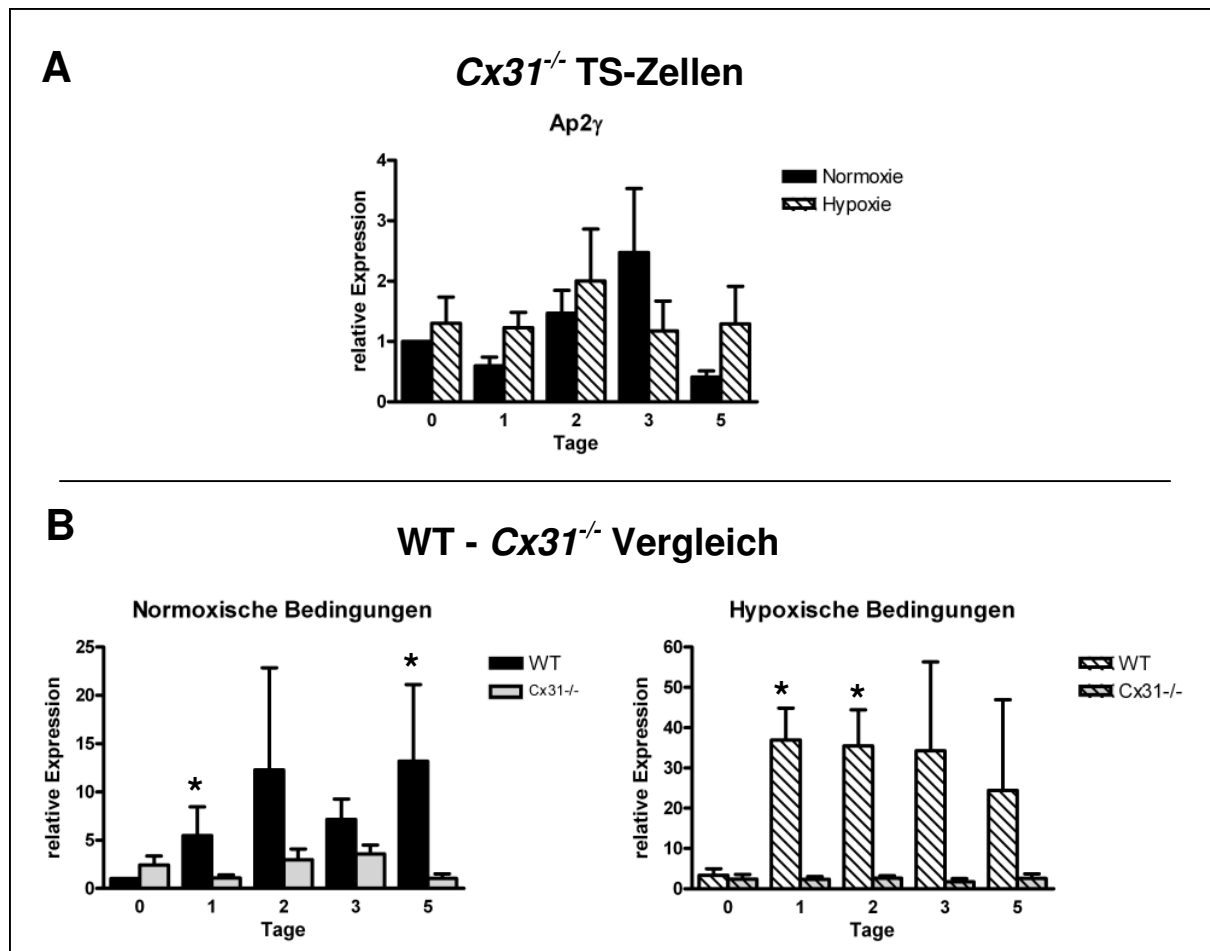
Der Verlust des *Cx31* Kanals wirkte sich somit nicht auf das Expressionsprofil der frühen Marker *Cdx2*, *Eomes* und *Mash2*, sowie der labyrinthären Marker *Gcm1* und *Cx26* aus, aber auf das Expressionsprofil des Sphingiotrophoblastmarkers *Tpbpa*. Da *Tpbpa* unter hypoxischen Bedingungen keinen Expressionsanstieg mehr zeigte, fördert die Hypoxie bei Verlust des *Cx31*-Kanals somit nicht mehr die Bildung des Sphingiotrophoblasten.



### 3.1.2.2.4 Die Expression des Transkriptionsfaktor *AP-2 $\gamma$* in *Cx31* defizienten TS-Zellen

Auf den ersten Blick zeigten die normoxisch und die hypoxisch inkubierten *Cx31*<sup>-/-</sup> TS-Zellen bezüglich der *AP-2 $\gamma$*  Amplifikate keinen signifikanten Unterschied (Abb. 3.13A).

Der Vergleich der Expressionen von *AP-2 $\gamma$*  unter normoxischen Bedingungen zeigte in *Cx31* defizienten TS-Zellen jedoch geringere *AP-2 $\gamma$*  Expressionen als in den WT TS-Zellen (Abb. 3.13 B).



**Abb. 3.13: Die Expressionen des Transkriptionsfaktors *AP-2 $\gamma$*  in WT und *Cx31*<sup>-/-</sup> TS-Zellen.** Bei allen hier dargestellten Versuchen wurde die relative Expression durch Real-Time-PCR bestimmt. Es wurden drei unabhängige Messungen durchgeführt und anschließend der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet. Die Werte sind gegen das entsprechende  $\beta$ -Aktin-Signal abgeglichen worden. Signifikante Differenzen sind gekennzeichnet (\* $\leq 0.05$ ). **A.** Vergleich der *AP-2 $\gamma$*  Expressionen in *Cx31*<sup>-/-</sup> TS-Zellen, die unter normoxischen oder hypoxischen Bedingungen kultiviert worden sind. **B.** Vergleich der *AP-2 $\gamma$*  Expressionen von WT TS-Zellen mit *Cx31*<sup>-/-</sup> TS-Zellen, die unter Normoxie oder entsprechend unter Hypoxie inkubiert worden sind.

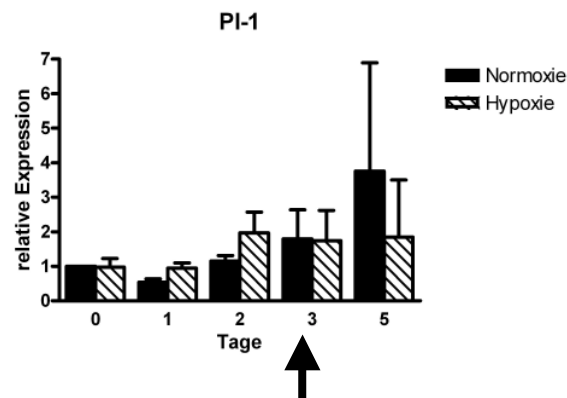
Besonders deutlich wurde diese Differenz der *AP-2 $\gamma$*  Expressionen in den Zellen, die unter hypoxischen Bedingungen kultiviert worden sind. Während bei den WT TS-Zellen noch eine deutliche Förderung der *AP-2 $\gamma$*  Expression erfasst werden konnte, blieb diese in den *Cx31* defizienten TS-Zellen nahezu aus. Das Expressionslevel blieb auf dem minimalen

Ausgangswert. Die in Abb. 3.13 A dargestellten Expressionen stellen somit nur noch minimale Hintergrundexpressionen von *AP-2γ* dar.

### 3.1.2.2.5 Die Expression des Trophoblast-Riesenzellmarker *PI-1* in *Cx31* defizienten TS-Zellen

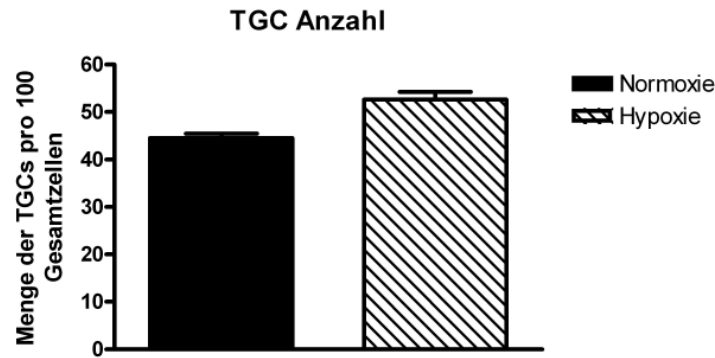
Der Marker für die Trophoblast-Riesenzellen *PI-1* zeigte unter Normoxie das charakteristische Expressionsprofil für die *Cx31*<sup>-/-</sup> TS-Zellen. So konnte auch hier ein früherer Expressionsstart vergleichend zu den WT TS-Zellen beobachtet werden (Pfeil).

Eine Förderung der *PI-1*-Expression durch Hypoxie konnte hier jedoch nicht mehr verzeichnet werden (Abb. 3.14). Die Expressionsstärke von *PI-1* war vom Beginn des Differenzierungszeitraumes an vergleichbar mit der *PI-1* Expressionsstärke aus den normoxisch kultivierten *Cx31* defizienten TS-Zellen



**Abb. 3.14: Die Expressionen des Riesenzellmarkers *PI-1* während der Differenzierung von *Cx31*<sup>-/-</sup> TS-Zellen unter normoxischen als auch unter hypoxischen Bedingungen.** Ermittlung der Werte wie unter Abb.3.5 beschrieben. Pfeile verdeutlichen die frühere stärkere Induktion der untersuchten Marker in den *Cx31*<sup>-/-</sup> TS-Zellen vergleichend zu den WT TS-Zellen (vergl. Abb. 3.6).

Die morphologischen Untersuchungen der *Cx31* defizienten Zellkulturen unterstützen die Ergebnisse aus der Transkriptionanalyse des Trophoblast-Riesenzellmarkers *PI-1*. Anders als bei den WT TS-Zellen konnte auch hier über den gesamten Differenzierungszeitraum von 7 Tagen keine erhöhte Anzahl der Trophoblast-Riesenzellen in den hypoxisch kultivierten Kulturen beobachtet werden. In Abb. 3.15 ist die TGC Anzahl an Tag 7 des Kultivierungszeitraumes dargestellt, die in beiden Kulturen bei 45-50 TGCs/100 Gesamtzellzahl lag.



**Abb. 3.15: Ermittelte Anzahl der TGCs in einer  $Cx31^{-/-}$  TS-Zellkultur.**  $Cx31^{-/-}$  TS-Zellen wurden über einen Zeitraum von 7 Tagen unter hypoxischen oder normoxischen Bedingungen ausdifferenziert. An Tag 7 wurde die Anzahl der TGCs pro 100 Gesamtzellzahl mittels der Lucia Image Software (Nikon) ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen von drei unabhängigen Differenzierungsreihen.

### 3.1.3 Vergleich des Einflusses von Hypoxie auf das Differenzierungsverhalten von WT TS-Zellen und $Cx31^{-/-}$ TS-Zellen

In den vorherigen Untersuchungen wurde mit Hilfe von spezifischen Trophoblastzelllinienmarker der Einfluss von Hypoxie auf das Differenzierungsverhalten von WT TS-Zellen und  $Cx31^{-/-}$  TS-Zellen näher untersucht. Diese Ergebnisse sind in Tab. 3.1 zusammengefasst worden.

**Tab. 3.1: Einfluss der Hypoxie auf das Differenzierungsverhalten von WT und  $Cx31^{-/-}$  TS-Zellen.** Tabellarischer Vergleich der Expressionsprofile der spezifischen Trophoblastzelllinienmarker der WT TS-Zellen und der  $Cx31^{-/-}$  TS-Zellen, die unter hypoxischen Bedingungen kultiviert worden sind. Die Aussagen stehen immer im Vergleich zu den jeweiligen Expressionsprofilen der Zellen, die unter Normoxie inkubiert worden sind. Die Marker oberhalb der roten Doppelbände zeigen ein ähnliches Expressionsprofil in den WT und den  $Cx31$  defizienten TS-Zellen, während die Marker unterhalb der roten Doppelbände Unterschiede aufweisen.

Trophoblastzelllinie	Spez. Marker	WT TS-Zellen	$Cx31^{-/-}$ TS-Zellen
Undifferenzierte Stammzellen	<i>Cdx2/Eomes</i>	Reduzierte Expression bereits im undifferenzierten Zustand	Reduzierte Expression bereits im undifferenzierten Zustand
Labyrinthäre Trophoblast	<i>Gcm1</i>	Keine signifikanten Unterschiede	Keine signifikanten Unterschiede
	<i>Cx26</i>	Reduzierte Expression im Verlauf der Differenzierung	Reduzierte Expression im Verlauf der Differenzierung
Spongiotrophoblast	<i>Mash2</i>	Frühere Runterregulierung, d.h. frühere Differenzierung entlang des Spongiotrophoblasten	Frühere Runterregulierung, d.h. frühere Differenzierung entlang des Spongiotrophoblasten
	<i>Tpbpa</i>	Erhöhte Expression im Verlauf der Differenzierung	Reduzierte Expression im Verlauf der Differenzierung
Trophoblast-Riesenzellen	<i>AP-2<math>\gamma</math></i>	Erhöhte Expression im Verlauf der Differenzierung	Generell nur noch minimale Expression
	<i>Pl-1</i>	Erhöhte Expression im Verlauf der Differenzierung	Keine signifikanten Unterschiede

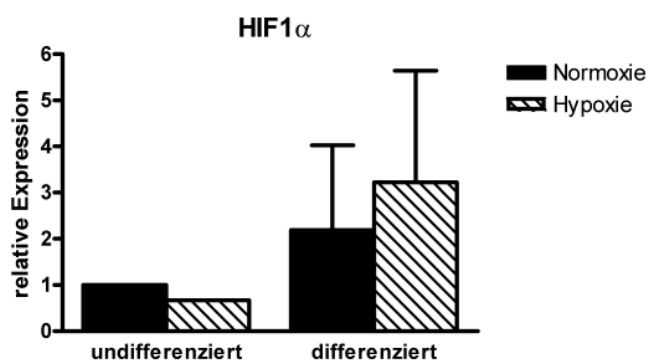
### 3.1.4 Rolle von HIF-1 $\alpha$ auf das Differenzierungsverhalten von TS-Zellen unter Hypoxie

In den vorherigen Untersuchungen konnte festgestellt werden, dass Hypoxie in WT TS-Zellen zu einer verzögerten Differenzierung in Richtung des Spongiotrophoblasten bzw. der Trophoblast-Riesenzellen führt. Im Folgenden sollte untersucht werden, ob HIF-1 $\alpha$  der Faktor ist, der die Veränderung des Expressionsprofils vermittelt.

Das HIF-1 $\alpha$  Protein wird in der Zelle konstitutiv synthetisiert und unter normoxischen Bedingungen direkt wieder über die Ubiquitin/Proteasom-Degradationskaskade abgebaut. Die Regulation dieses Abbauprozesses erfolgt über die Prolylhydroxylasen (PHDs), die zwei bestimmte Prolinreste des HIF-1 $\alpha$  Proteins hydroxylieren, welches zur Interaktion mit dem von-Hippel-Lindau-Tumorsuppressorprotein (pVHL) führt. Das pVHL beinhaltet eine Ubiquitinligase, welche die Ubiquitinierung von HIF-1 $\alpha$  vollzieht und das HIF-1 $\alpha$  somit von den Proteasomen abgebaut werden kann (Kenneth et al., 2008).

Unter hypoxischen Bedingungen wird das HIF-1 $\alpha$  Protein stabilisiert und wandert in den Zellkern, wo es mit dem ubiquitinär expremierten HIF1 $\beta$  /ARNT-Komplex dimerisiert und als Transkriptionsfaktor eine Reihe von Faktoren transaktiviert, die z.B. für die Zellproliferation oder für die Angiogenese verantwortlich sind (Kenneth et al., 2008).

In WT TS-Zellen konnte ebenfalls eine konstitutive Expression der mRNA für *Hif1 $\alpha$*  nachgewiesen werden. Abb. 3.16 verdeutlicht, dass sowohl in undifferenzierten, als auch in differenzierten Zellen ein nahezu identisches Expressionslevel von *Hif1 $\alpha$*  detektiert werden konnte. Dieses Expressionslevel war dabei unabhängig von der Sauerstoffumgebung.



**Abb. 3.16: *Hif1 $\alpha$*  Expression in undifferenzierten und differenzierten WT TS-Zellen.** WT TS-Zellen wurden nach 24h in proliferativem Medium geerntet oder durch die Wegnahme von FGF4 und Heparin und dem konditionierten Medium in die Differenzierung geschickt. Die differenzierten Zellen wurden dann nach weiteren 48h geerntet. Mittels Real-Time-PCR wurde die relative *Hif1 $\alpha$*  Expression bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen aus zwei unabhängigen Messungen.

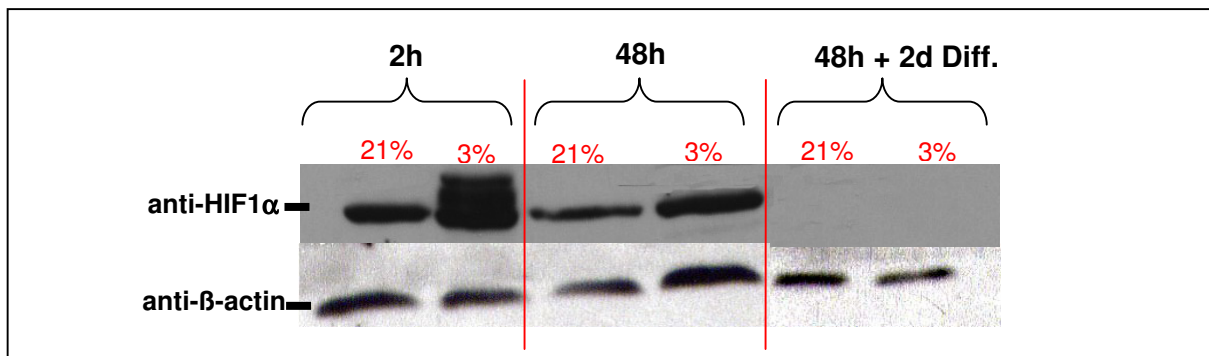
### 3.1.4.1 Stabilisierung des HIF-1 $\alpha$ Proteins in WT TS-Zellen

Im weiteren wurde die Stabilisierung des HIF-1 $\alpha$  Proteins in WT TS-Zellen analysiert. Dazu wurden die Proteine der WT TS-Zellen nach 2h und nach 48h in Stammzellmedium unter hypoxischen Bedingungen geerntet oder wurden zusätzlich nach den 48h in differenzierendem Medium überführt und dann nach weiteren 2 Tagen Inkubation unter Hypoxie geerntet. Als Kontrolle dienten die gleichen Kulturansätze jeweils unter normoxischen Bedingungen kultiviert.

Abb. 3.17 zeigt, dass das Expressionslevel von HIF-1 $\alpha$  unter normoxischen Bedingungen sehr gering war, nach 2h Kultivierung unter Hypoxie dann aber aufgrund der Stabilisierung des Proteins stark anstieg.

Nach 48h Inkubation in undifferenzierendem Medium konnte ein Abbau des HIF-1 $\alpha$  Proteins beobachtet werden, da hier nun ein ähnliches Expressionslevel wie unter normoxischen Bedingungen vorlag. Nach der Überführung in differenzierendem Medium für weitere 48h ist das HIF-1 $\alpha$  Protein sowohl in den hypoxisch, als auch in den normoxisch kultivierten Zellen vollständig abgebaut worden.

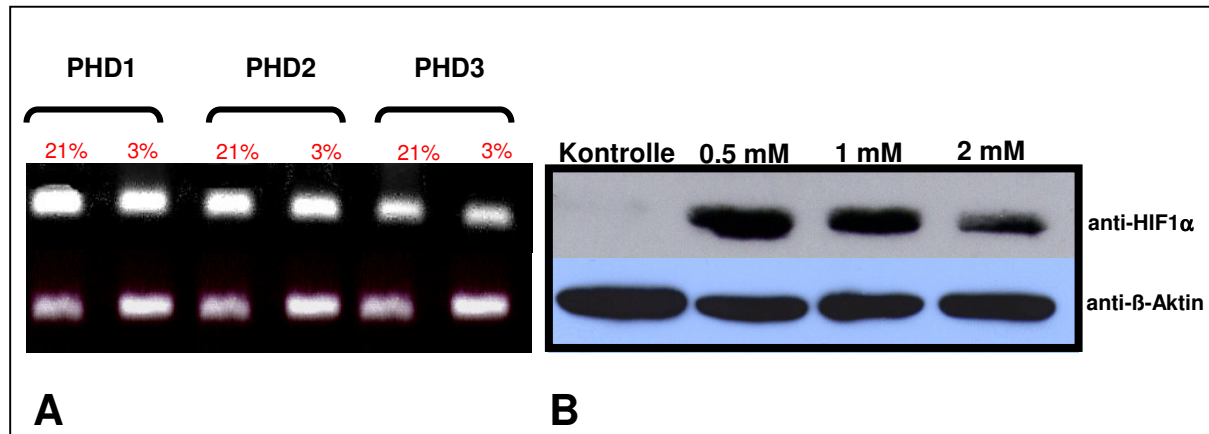
Das HIF-1 $\alpha$  Protein wird demnach in WT TS-Zellen nur in den ersten Stunden durch hypoxische Bedingungen stabilisiert und danach im Laufe des Differenzierungsprozesses wieder abgebaut.



**Abb. 3.17: Western-Blot-Analyse zur Stabilisierung des HIF-1 $\alpha$  Proteins in WT TS-Zellen.** WT TS-Zellen wurden für 2h und für 48h in proliferativem Medium unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen kultiviert und anschließend die Proteine geerntet. Zusätzlich wurde nach den 48h die Differenzierung durch das Fehlen von FGF4, Heparin und konditioniertem Medium induziert und nach weiteren 2 Tagen die Proteine geerntet. Die Proteine (50  $\mu$ g/Bande) wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mit dem HIF-1 $\alpha$  Antikörper inkubiert. Die Blots wurden gestrippt und zur Expressionskontrolle mit dem  $\beta$ -Aktin-Antikörper versetzt. Diff.: Differenzierende Bedingungen.

### 3.1.4.2 Die Behandlung mit DMOG

Mittels Dimethyloxaloylglycin (DMOG), welches ein Inhibitor der Prolylhydroxylasen ist, wird auch unter Normoxie das HIF-1 $\alpha$  Protein stabilisiert. Somit kann ein hypoxisches Milieu simuliert werden.



**Abb. 3.18: DMOG Vorversuche.** **A.** Die Expression von den Prolylhydroxylasen PHD1, PHD2 und PHD3 in WT TS-Zellen. Die Zellen wurden für 24h in undifferenzierendem Medium unter normoxischen (21%) oder hypoxischen (3%) Bedingungen kultiviert. **B.** Western-Blot-Analyse des HIF-1 $\alpha$  Proteins nach Zugabe von DMOG. WT TS-Zellen sind in undifferenzierendem Medium unter Normoxie inkubiert worden. Nach 24h erfolgte die Zugabe von 0.5mM, 1mM und 2mM DMOG. Der Kontrollansatz blieb unbehandelt. Die Ernte der Proteine erfolgte nach 2h.

Die drei Prolylhydroxylasen PHD1-3 konnten in den undifferenzierten WT TS-Zellen, die sowohl unter Normoxie als auch unter Hypoxie kultiviert worden sind, nachgewiesen werden (Abb. 3.18 A).

Um eine DMOG-Konzentration für eine optimale HIF-1 $\alpha$  Stabilisierung unter Normoxie, die mit einer guten Zellverträglichkeit vereinbar ist, zu bestimmen, wurden die Zellen im undifferenzierten Zustand mit 0.5 mM, 1 mM und 2 mM DMOG versetzt.

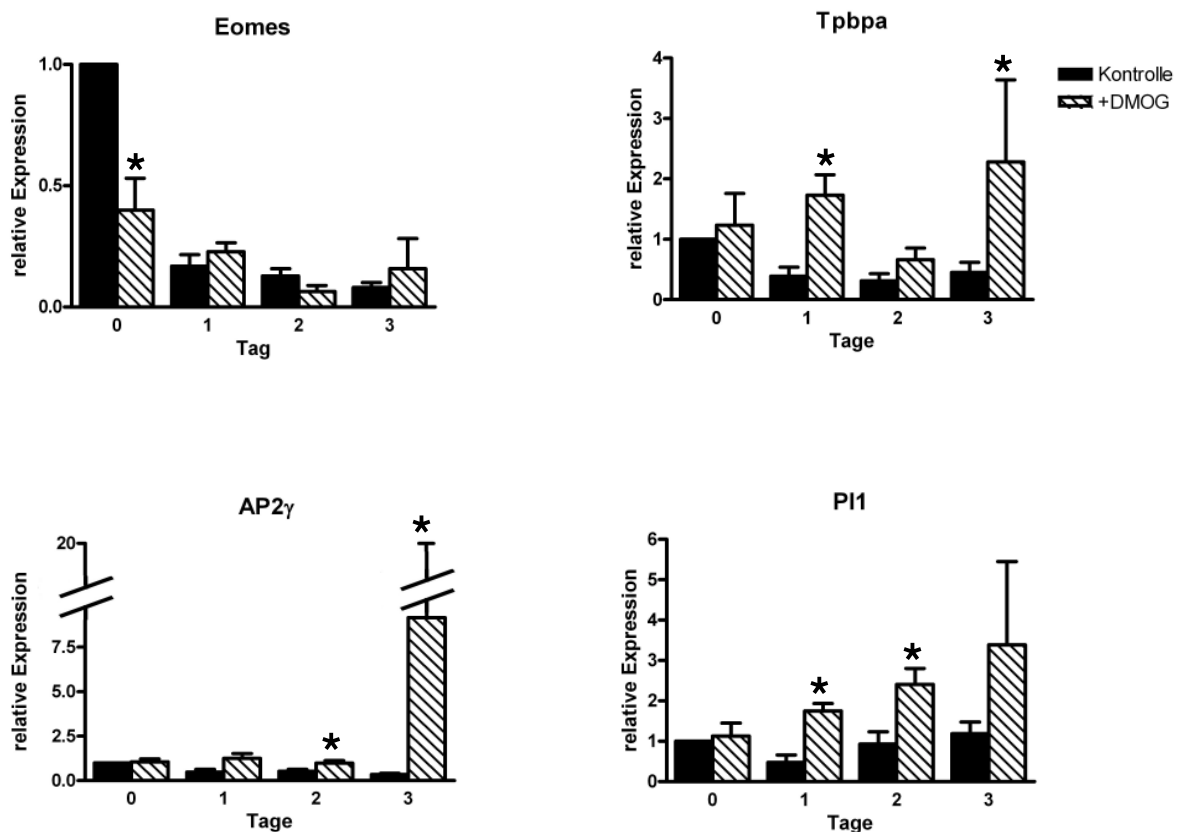
Die Zugabe von 0.5 mM DMOG zu den Zellen ergab die beste HIF-1 $\alpha$  Stabilisierung. Höhere Konzentrationen ergaben geringere Ausbeuten von dem HIF-1 $\alpha$  -Protein, was wohl an dem zunehmenden Vitalitätsverlust der Zellen aufgrund der erhöhten DMOG-Konzentration lag (Abb. 3.18 B).

Für die folgenden Differenzierungsversuche wurden die Zellen dann mit 0.5 mM DMOG versetzt und analog zu den Hypoxieversuchen wurde die RNA an den Tagen 0, 1, 2 und 3 aufgearbeitet. Der Differenzierungsverlauf wurde anschließend anhand der Marker *Eomes*, *Tpbpa*, *AP-2 $\gamma$*  und *PI-1* untersucht (Abb. 3.19). Diese Marker wurden ausgewählt, da sie sensibel auf Hypoxie reagiert hatten (s. 3.1.1.3.1, 3.1.1.3.3, 3.1.1.3.4).

Die Zellen, welche mit DMOG versetzt worden sind, zeigten im Vergleich zu den unbehandelten Zellen bereits im undifferenzierten Zustand (Tag 0) eine Erniedrigung der *Eomes*-Transkripte, während die Expressionen des Sphingiotrophoblastmarkers *Tpbpa* und

der Trophoblast-Riesenzellmarkern *AP-2 $\gamma$*  und *PI-1* signifikant erhöht waren. Diese Resultate korrelieren mit den Ergebnissen der TS-Zellen, die unter Hypoxie kultiviert worden sind. Hier konnte auch ein früherer Verlust des Stammzellmarkers *Eomes* beobachtet werden, welches zu einer verstärkten Differenzierung der Zellen in Richtung des Spongiotrophoblasten und der Trophoblast-Riesenzellen führte.

Die Zugabe von DMOG führte also zu dem gleichen Differenzierungsverlauf, wie jener, der unter Hypoxie beobachtet werden konnte.



**Abb. 3.19: Effekt von DMOG auf den Differenzierungsprozess von WT TS-Zellen.** WT TS-Zellen sind unter Normoxie im undifferenzierten Zustand für 24h mit 0.5 mM DMOG inkubiert worden (Tag 0). Anschließend wurden die Zellen für 3 weitere Tage in differenzierendes Medium, welches ebenfalls mit 0.5 mM DMOG versetzt worden ist, überführt. Die aufgearbeitete mRNA wurde mittels Real-Time-PCR analysiert. Angegeben sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen von drei unabhängigen Messungen, die gegen das entsprechende  $\beta$ -Aktin-Signal abgeglichen worden sind. Signifikant unterschiedliche Werte sind gekennzeichnet (\* $\leq 0.05$ ).

### 3.2 Die *Cx31F137L*-Punktmutation

Aus den hier dargestellten Untersuchungen wird ersichtlich, dass der Verlust des Connexin31 Kanals mit einer Reduktion der *AP-2 $\gamma$*  Expression verbunden ist. Die *AP-2 $\gamma$*  knock-out Maus zeigt einen plazentaren Phänotyp, bei dem die extraembryonalen Gewebe unterentwickelt oder fehlorganisiert waren: So ist der Ektoplazentarkonus aufgrund einer verminderten Proliferation seiner Zellen reduziert und schlecht integriert, die Anzahl der Riesenzellen ist verringert und die Labyrinthschicht nicht richtig ausgebildet (Auman et al., 2002). Diese Ähnlichkeiten in den Funktionen des Cx31 Kanals und des AP-2 $\gamma$  für die Proliferation der Trophoblast-Stammzellen hat zu einer Kooperation mit der Gruppe von Prof. Schorle, Universität Bonn, geführt. Bei dieser Zusammenarbeit soll untersucht werden, inwieweit AP-2 $\gamma$  und Connexin31 funktionell und biochemisch in Zusammenhang stehen und synergistisch die Proliferationskapazität der Trophoblast-Stammzellen beeinflussen.

In der Gruppe von Prof. Willecke konnten Schnichels et al. (2007) eine Maus generieren, die eine Punktmutation in der Aminosäureposition 137 aufweist. Durch diese Punktmutation erfolgt ein Austausch von Phenylalanin (F) gegen ein lipophiles Leucin (L) im Cx31 Protein. Die heterozygote Maus konnte als Modell der humanen Erbkrankheit *Erythrokeratoderma variabilis*, die genau diese Punktmutation im humanen Genom enthält, etabliert werden. Die Mutation wurde durch eine homologe Rekombination, wo die WT Region des *Cx31*-Gens durch eine *Cx31* codierende Region, einem *neoR*-Gen und einer *Cx31F137L* codierenden - Region ersetzt wurde, erzeugt. Die codierende *Cx31* Region und das *neoR*-Gen, die durch loxP Seiten flankiert waren, wurden anschließend mittels Cre Rekombinase entfernt.

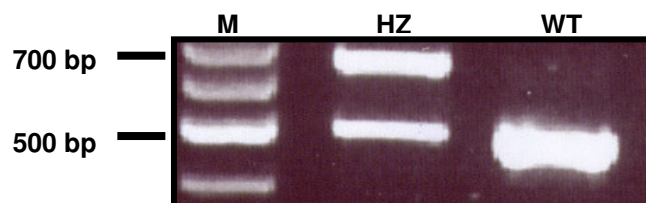
Die Verpaarungen von zwei *Cx31<sup>+/F137L</sup>* Tieren zeigten, dass die heterozygot expremierenden Mauslinien in der erwarteten Mendelschen Wahrscheinlichkeit geboren worden sind, aber eine veränderte Morphologie der Plazenten aufwiesen. Interessanterweise sterben aber homozygote Embryonen des Genotyps *Cx31F137L* direkt nach der Implantation am Tag E7.5 ab. Damit zeigen sie genau den gleichen Phänotyp wie die homozygote *AP-2 $\gamma$*  defiziente Maus und es ergibt sich die Frage, ob nicht der Transkriptionsfaktor und auch das Strukturprotein hier in einer koordinierten Weise das TS-Zellverhalten steuern. TS-Zellen von *AP-2 $\gamma$*  knock-out Mäusen konnten bisher nicht generiert werden, sind aber derzeit in der Gruppe von Prof. Schorle (Universität Bonn) in Bearbeitung, um das gefloxtete *AP-2 $\gamma$* -Gen durch eine Cre-Rekombinase zu verschiedenen Zeitpunkten der Trophoblast-Stammzellentwicklung in Kultur zu eliminieren. Entsprechend sollen in unserer Gruppe TS-Zellen etabliert werden, die diese Punktmutation im *Connexin31*-Gen enthalten. Sowohl die gefloxteten als auch die ungefloxteten Mausmutanten sind bereits aus dem Labor von Prof. Willecke (Universität Bonn) zur Verfügung gestellt worden. In meiner vorliegenden



Arbeit soll nun zunächst eine genaue Phänotypanalyse der Plazenten der heterozygoten Mäuse, die bereits im heterozygoten Zustand einen plazentaren Defekt aufwiesen, durchgeführt werden, die im Folgenden beschrieben werden.

### 3.2.1 Nachweis der Genotypen der untersuchten Mäuse

Es wurden *Cx31*<sup>+/F137L</sup> Mäuse miteinander verpaart und die Embryonen der Tage 12.5 pc und 14.5 dc präpariert und mittels PCR genotypisiert. Für die PCR-Reaktion wurden entweder Teile des Embryos oder der Amnionhülle, welches ebenfalls aus embryonalem Gewebe besteht, eingesetzt.



**Abb. 3.20: Genotypisierung der Embryonen aus einer *Cx31*<sup>+/F137L</sup> Verpaarung.** Die Detektion des Wildtyps (WT) und des mutierten *Cx31*<sup>F137L</sup> Gens in der aus Embryonen isolierten DNA erfolgte mittels PCR. Es wurden Primer eingesetzt, die spezifisch für die kodierende Region des *Cx31*-Gens (500 bp) bzw. für die kodierende Region des *Cx31*<sup>F137L</sup>-Gens (651 bp) waren. Dargestellt ist die Auftrennung der PCR-Produkte in einer Agarose-Gelelektrophorese. M: Marker, HZ: Heterozygoter Embryo (*Cx31*<sup>+/F137L</sup>), WT: Wildtyp Embryo.

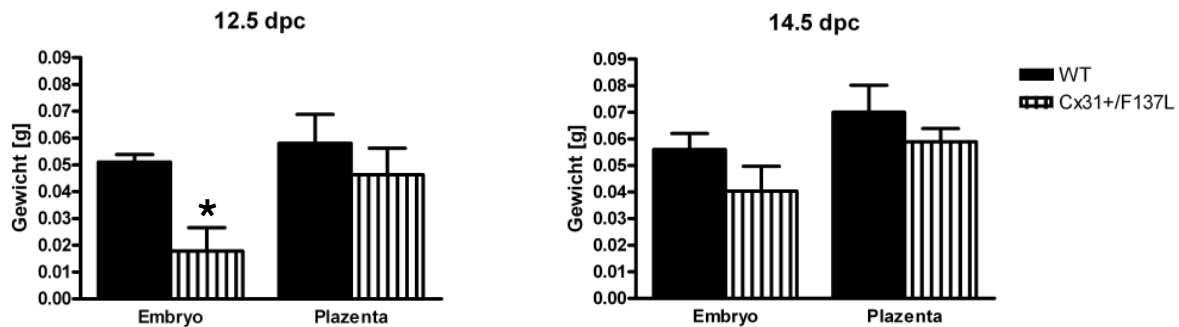
Wie aus Tab. 3.2 hervorgeht, konnte an den Tagen 12.5 pc und an den Tagen 14.5 pc keine homozygoten Tiere erhalten werden, welches mit den Beobachtungen von Schnichels et al. (2007) übereinstimmt. Die heterozygoten Tiere und die WT Tiere sind ebenfalls mit einer ungefähren Mendelschen Häufigkeit aufgetreten, wobei der WT Anteil jedoch um 15% erhöht war.

**Tab. 3.2 : Genotypenverhältnisse der Embryonen aus *Cx31*<sup>+/F137L</sup> Verpaarungen**

Stadium	Analysierte Anzahl	Genotyp		
		WT	<i>Cx31</i> <sup>+/F137L</sup>	<i>Cx31</i> <sup>F137L</sup> / <i>F137L</i>
12.5 dpc	22	9	13	0
14.5 dpc	17	7	10	0
Summe	39	16	23	0
Anteil	100%	41%	59%	0%

### 3.2.2 Gewichte der *Cx31+/F137L* Plazenten und Embryonen

An den Tagen 12.5 pc und 14.5 pc wurden die Gewichte der Embryonen und der Plazenten aus den *Cx31+/F137L* Verpaarungen bestimmt (Abb. 3.21).

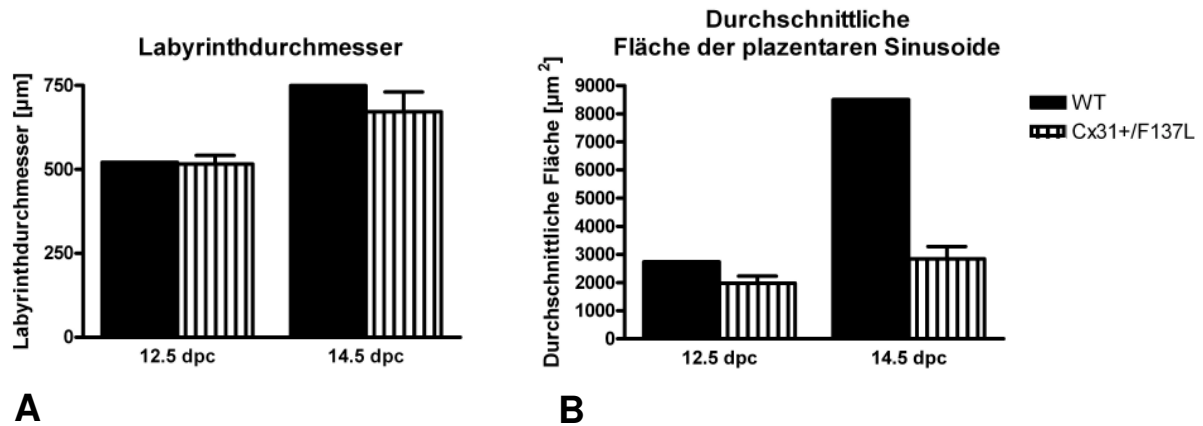


**Abb. 3.21: Embryonen und Plazentengewichte aus *Cx31+/F137L* Verpaarungen.** Die Plazenten und die Embryonen wurden an den Tagen 12.5 pc und 14.5 pc präpariert, mittels PCR genotypisiert und die einzelnen Gewichte bestimmt. Es wurden die Mittelwerte und die Standardabweichungen berechnet. Werte, die sich signifikant unterscheiden, sind gekennzeichnet (\* $\leq 0.05$ ).

Am Tag 12.5 pc lagen die Plazentengewichte bei den unterschiedlichen Genotypen zwischen 0.05 g und 0.06 g und waren somit sehr ähnlich. Die Embryonengewichte jedoch wichen signifikant voneinander ab. Während beim WT noch Gewichte von ca. 0.05 g ermittelt werden konnten, zeigten der *Cx31+/F137L* Genotyp eine mehr als 50%-ige Gewichtsreduktion (ca. 0.018 g). Diese signifikante Gewichtsreduktion konnte bei den 14.5 dpc Embryos jedoch nicht mehr beobachtet werden. Hier waren die Gewichte der Plazenten und der Embryonen bei den *Cx31+/F137L* Tieren nur noch minimal geringer.

### 3.2.3 Histologische Auswertung der *Cx31+/F137L* Plazenten

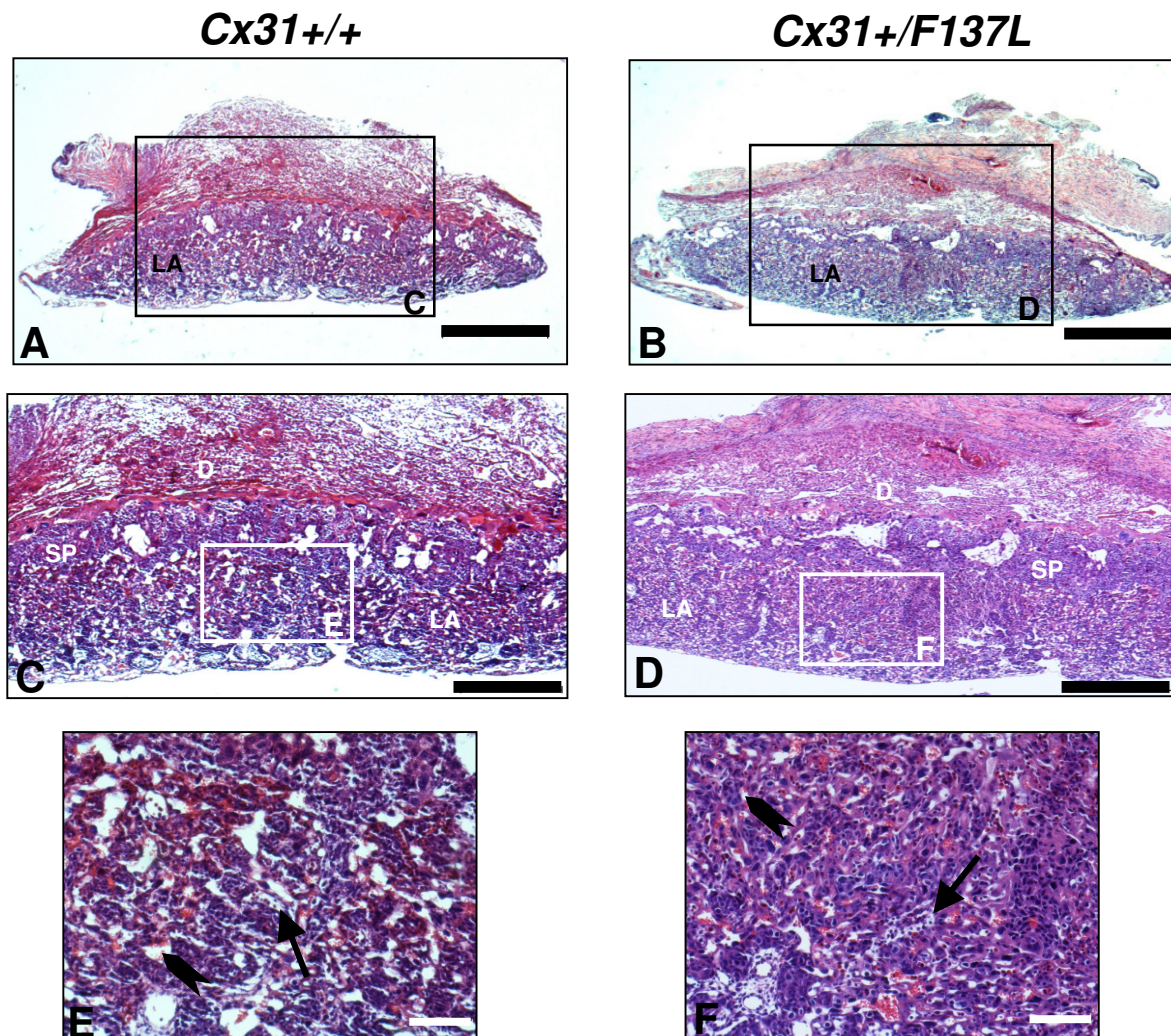
Die histologische Auswertung der 12.5 dpc Plazenten (Abb. 3.23) erfolgte anhand von Schnitten in der Region der Nabelschnur. Sie ergab, dass die drei verschiedenen Trophoblastschichten (Spongiotrophoblast, Labyrinth und Trophoblast-Riesenzellen) bei beiden Genotypen vollständig ausgebildet waren. Jedoch konnte man bei den *Cx31+/F137L* Plazenten ein kompakteres Labyrinth beobachten (Abb. 3.23 D, F). Dieses Labyrinth wies kleinere Zwischenräume, die mit maternalem Blut gefüllt waren und reduzierte Durchmesser der fetalen Blutgefäße auf (Abb. 3.23 F). Diese Beobachtungen wurden mit Hilfe der Lucia Image Software (Nikon) bestätigt, mit der ebenfalls an Tag 12.5 pc ein reduziertes Lumen der maternalen Gefäße ermittelt wurde (Abb. 3.22 B).



**Abb. 3.22: Bestimmung von Labyrinthparametern von WT und *Cx31+/F137L* Plazenten.** Die Parameter wurden mittels der Lucia Image Software (Nikon) an den Tagen 12.5 pc und 14.5 pc bestimmt. **A.** Ermittlung der durchschnittlichen Labyrinthgröße. **B.** Bestimmung der durchschnittlichen Fläche der placentaren Sinusoide des Labyrinthes.

Ein kompakteres, nicht richtig ausdifferenziertes Labyrinth des *Cx31+/F137L* Genotyps wurde auch bei den 14.5 dpc Plazenten beobachtet (Abb. 3.24 B,D,F). Während auch hier der Durchmesser des Labyrinthes der WT und der *Cx31+/F137L* Plazenten annähernd gleich war (Abb. 3.22 A), war die Fläche der placentaren Sinusoide im Labyrinth der mutierten Plazenten deutlich reduziert (Abb. 3.22 B). Auch der Spongiotrophoblast erschien in der morphologischen Ausbildung bei den *Cx31+/F137L* Plazenten an Tag 14.5 pc kompakter zu sein (Abb. 3.24 B).

12.5 dpc

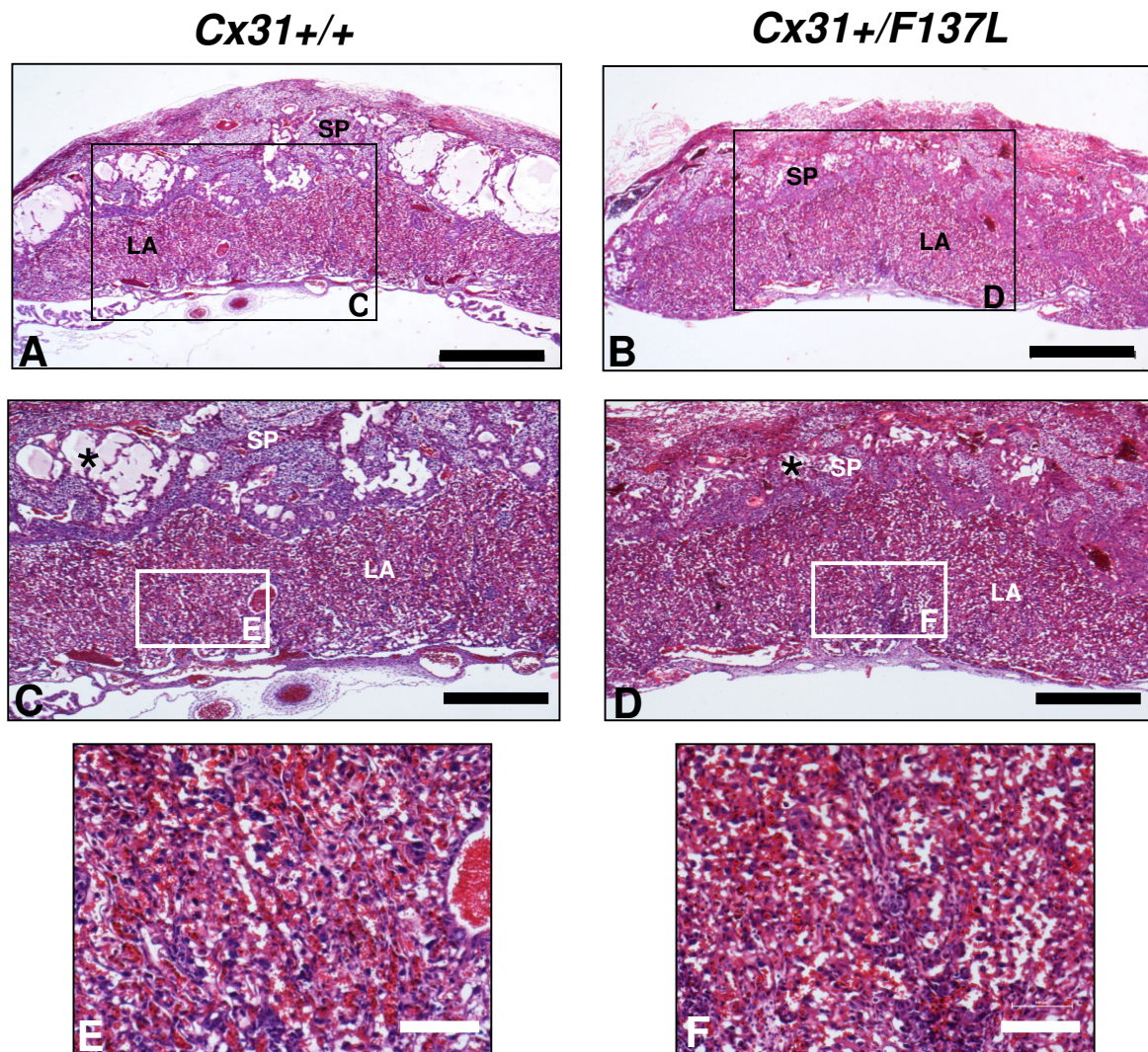


**Abb. 3.23: Histologische Analyse von Wildtyp und *Cx31+/F137L* Plazenten.** HE-gefärbte Schnitte von WT (A,C,E) und *Cx31+/F137L* Plazenten (B,D,F) an Tag 12.5 pc. (A) und (B) zeigen Übersichten. (C)-(F) zeigen die durch Rechtecke gekennzeichneten höheren Vergrößerungen. D: Dezidua, LA: Labyrinth, SP: Spongiotrophoblast. Pfeile: fetale Gefäße; Pfeilspitzen: maternale Gefäße. Balken in A,B: 1000  $\mu$ m; in C,D: 500  $\mu$ m; in E,F: 100  $\mu$ m.

Die *Cx31F137L* Punktmutation führte also zu einer gestörten oder auch verlangsamten Ausdifferenzierung des Labyrinthes, welches eine kompaktere Struktur bedingt durch die geringere Volumina der fetalen und maternalen Gefäße im Vergleich zur WT Plazenta besaß. Der Embryo konnte wohl durch diese gestörte Differenzierung nicht mehr ausreichend mit Nährstoffen versorgt werden und zeigte somit im Vergleich zum WT Embryo an Tag 12.5 pc ein signifikant reduziertes Gewicht (Abb. 3.21). Das das Plazentagewicht dagegen jedoch nur geringfügig reduziert war, ist der beobachtete Phänotyp vermutlich auf



14.5 dpc

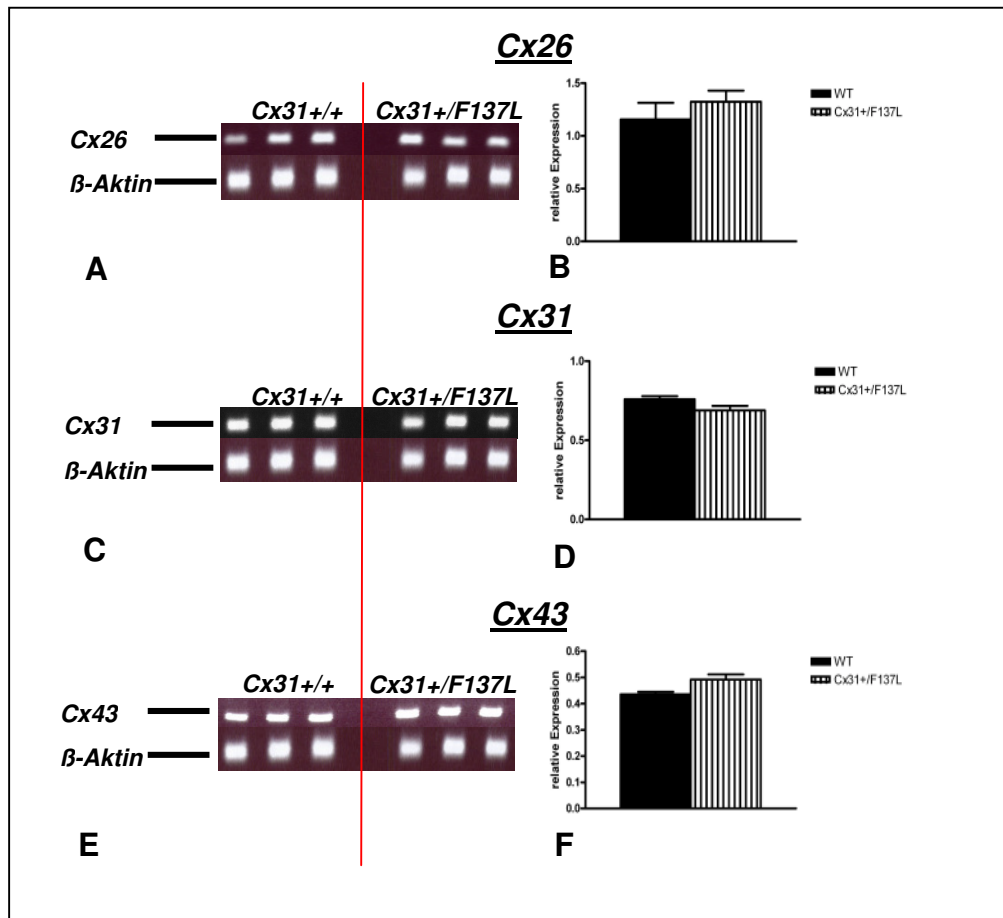


**Abb. 3.24: Histologische Analyse von Wildtyp und *Cx31+/F137L* Plazenten.** HE-gefärbte Schnitte von WT (A,C,E) und *Cx31+/F137L* Plazenten (B,D,F) an Tag 14.5 pc. (A) und (B) zeigen Übersichten. (C)-(F) zeigen die durch Rechtecke gekennzeichneten höheren Vergrößerungen. LA: Labyrinth, SP: Spongiotrophoblast. Sterne: Lakunen im Spongiotrophoblasten. Balken in A,B: 1000 µm; in C,D: 500 µm; in E,F: 100 µm.

eine physiologische Ursache, wie z.B. eine zu geringe Transportrate oder eine zu geringe Austauschfläche zurückzuführen.

### 3.2.3.1 Expressionsanalyse von *Cx43*, *Cx31* und *Cx26* in der *Cx31F137L*- Plazenta

Es ist bekannt, dass durch Mutation eines Connexinsgens oft auch die anderen co-exprimierten Connexine eine veränderte Expressionsstärke zeigen (Plum et al., 2000). Aus diesem Grunde sollte nun untersucht werden, ob die *Cx31F137L* Punktmutation einen Einfluss auf die Expression der anderen Connexine (*Cx26*, *Cx31*, *Cx43* und *Cx31.1*) in der Mausplazenta besitzt.



**Abb. 3.25:** Beeinflussung der Expressionen der Connexine *Cx26*, *Cx31* und *Cx43* in der *Cx31F137L* Plazenta an Tag 14.5 pc. Es wurden semiquantitative RT-PCRs mit den entsprechenden Primern durchgeführt. Die erhaltenen Banden wurden densitometrisch ausgewertet und gegen das entsprechende  $\beta$ -Aktin abgeglichen. Als Kontrolle wurde bei der RT-PCR mRNA aus WT-Plazenten eingesetzt. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen. **A, C, E:** Agarosegele der aufgetragenen RT-PCRs. Es sind die Produkte von den RT-PCRs aus den WT-Plazenten (*Cx31*<sup>+/+</sup>) und aus den mutierten Plazenten (*Cx31*<sup>+/F137L</sup>) aufgetragen. **B, D, F:** Graphische Darstellung der densitometrischen Auswertung.

*Cx26* verbindet im Labyrinth der Mausplazenta die beiden Schichten des Synzytiotrophoblasten miteinander (Gabriel et al., 1998; Pauken et al., 1995) und führt bei einer gezielten Inaktivierung zu einem intrauterinen Tod der Embryonen an Tag 9,5 pc aufgrund einer gestörten feto-maternalen Glukosediffusion über die Plazentabarriere (Gabriel

et al.,1998). In den *Cx31F137L* Plazenten konnte eine Fehldifferenzierung des Labyrinthes beobachtet werden, die an Tag 12.5 pc zu einer Unterernährung des Embryos führte.

Obwohl diese Unterernährung des Embryos dem Phänotyp der *Cx26* KO Tiere ähnelte und somit ein Einfluss der Mutation auf dieses Connexin vermutet werden konnte, waren die Expressionslevel von *Cx26* in den *Cx31F137L*-Plazenten vergleichbar mit den Expressionsleveln in den WT Plazenten (s. Abb. 3.24 A,B).

Die Expression von *Cx31* ist charakteristisch für den Spongiotrophoblasten und führt bei einer gezielten Inaktivierung zu einer Dysmorphogenese der Plazenta, die den Tod von 60% der Embryonen zur Folge hat (Plum et al., 2001). Die Dysmorphogenese der Plazenta zeichnet sich neben einem reduzierten Labyrinth und einem reduzierten Spongiotrophoblasten durch eine stark erhöhte Anzahl von Trophoblast-Riesenzellen aus. Bei der Erfassung des Expressionslevel von *Cx31* in den *Cx31F137L* Plazenten konnte kein Unterschied zwischen den WT Plazenten und den heterozygoten Plazenten beobachtet werden (s. Abb. 3.25 C, D).

Auch die Expression von *Cx43*, welche ab Tag 10.5 pc im Spongiotrophoblasten induziert wird (Plum et al., 2001), zeigte in den *Cx31F137L* Plazenten ein ähnliches Transkriptionslevel, wie in den WT Plazenten (Abb. 3.25 E, F).

Die *Cx31.1* Expression konnte leider nicht erfasst werden.

## 4 Diskussion

Die Plazenta, die als erstes embryonales Organ während der Schwangerschaft der Säugetiere gebildet wird, ist essentiell für die intrauterine Entwicklung des Embryos. Funktionsstörungen oder Fehlentwicklungen der Plazenta können zu einer Reihe von Schwangerschaftserkrankungen führen, die u.a. zur Wachstumsretardierung des Embryos *in-utero* oder sogar zum Abort führen können.

Aber auch Krankheiten im adulten Alter wie z.B. Diabetes (Jansson et al., 2007), Bluthochdruck und Herzkrankheiten (Barker et al., 1995; Barker et al., 1997) können auf eine gestörte Plazentaentwicklung/-funktion während der Embryogenese zurückgeführt werden.

Aus diesem Grunde wurden in den letzten Jahren die Forschung auf dem Gebiet der Plazentaentwicklung intensiviert. Jedoch ist in Deutschland die Forschung an menschlichen Trophoblastzellen nur in einem Stadium erlaubt, in dem diese schon weit differenziert sind. So ist die Untersuchung der molekularen Mechanismen, die zur potentiellen Fehlleitung der Plazentaentwicklung führen können, nur anhand von Tiermodellen möglich (Graevendieck et al., 2008). Da die murine Plazenta, ebenfalls wie die humane Plazenta zum Typ der hämochorialen Plazenta gehört, wird die Maus gerne als Modellorganismus verwendet. Jedoch unterscheiden sich die beiden Plazenten in ihrem histologischen Aufbau, da beim Menschen eine Zottenplazenta vorliegt, während die Maus eine labyrinthartige Invagination aufweist. Den verschiedenen Plazentaschichten kann jedoch eine starke physiologische Homologie zugeordnet werden (Cross et al., 2000): So entspricht der extravillöse Zytotrophoblast des Menschen dem Spongiotrophoblasten der Maus, wogegen der villöse Trophoblast des Menschen dem Labyrinth der Maus zuzuordnen ist. Die Trophoblast-Riesenzellen, die in das maternale Gewebe invadieren und dort die Spiralarterien/ bzw. die maternalen Arteriolen eröffnen und somit die Blutzufuhr von der Mutter zum Embryo fördern, sind in beiden Plazentatypen zu finden.

Auch die molekularen Mechanismen, die der Plazentation zugrunde liegen, sind in beiden Spezies in einem gewissen Umfang vergleichbar (Cross et al., 2000).

In den letzten Jahren konnten eine Reihe von Faktoren identifiziert werden, die für eine korrekte und vollständige Entwicklung der Plazenta notwendig sind. Dazu gehören z.B. eine Reihe von Transkriptions- und Wachstumsfaktoren, aber auch die interzelluläre Kommunikation über die Gap Junctions spielt eine wichtige Rolle (Dahl et al., 1996; Gabriel et al., 1998; Plum et al., 2001). Gap Junction Kanäle werden durch Connexinproteine aufgebaut, die im Verlauf der Plazentaentwicklung der Maus in einem definierten Muster exprimiert werden (Davies et al., 1996; Houghton et al., 2002). Dabei ist *Cx31* das charakteristische Connexin der frühen Trophoblastzelllinie. Die reife murine Plazenta weist



dagegen eine geordnete Expression verschiedener Connexinproteine auf. So exprimiert der Synzytiotrophoblast des Labyrinthes *Cx26*, während der Spongiotrophoblast eine starke *Cx31* und *Cx31.1* Expressionen aufweist (Gabriel et al., 1998; Zheng-Fischöfer et al., 2007). Mit fortschreitender Differenzierung wird die *Cx31.1* Expression im Spongiotrophoblasten jedoch reprimiert, wogegen die *Cx43* Expression ab Tag E10.5 induziert wird. Eine *Cx31.1* Expression ist ab diesem Zeitpunkt nur noch in den Glykogenzellen zu finden (Zheng-Fischöfer et al., 2007). Die Trophoblast-Riesenzellen hingegen zeigen die ausschließliche Expression von *Cx43*.

In einigen vorausgehenden Studien konnte gezeigt werden, dass auch die anfänglich niedrige Sauerstoffkonzentration, die im Uterus vorliegt, die Differenzierung der Plazenta beeinflusst (Rosario et al., 2008; Genbacev et al., 2001). So konnte z.B. während der frühen Schwangerschaft beim Menschen ein Sauerstoffgehalt von ungefähr 2.5% im Uterus ermittelt werden (Rodesch et al., 1992). Der Einfluss einer hypoxischen Umgebung auf das Differenzierungsverhalten der Plazenta ist jedoch stark umstritten. So konnte in einigen Studien gezeigt werden, dass ein niedriger Sauerstoffgehalt z.B. die Migration des Trophoblasten in das maternale Gewebe fördert. Dieser Prozess ist mit einer Verschiebung des proliferativen Phänotyps zum invasiven Phänotyp begleitet und korreliert mit einer stärkeren Ausbildung der Trophoblast-Riesenzellen (Graham et al., 2000; Hayashi et al., 2005; Rosario et al., 2008). Andere Studien dagegen konnten anhand von humanen villösen Explants oder Trophoblast-ähnlichen Zelllinien belegen, dass niedrige Sauerstoffbedingungen den invasiven Phänotyp inhibieren (Zhou et al., 1997; Caniggia et al., 2000; Lash et al., 2006).

Kibschull et al. (2004) hat aus 3.5 dpc alten Blastozysten Trophoblaststammzellen etabliert und hier das Proliferations- und Differenzierungsverhalten von WT TS-Zellen und *Cx31* defizienten TS-Zellen näher analysiert. Dabei konnte gezeigt werden, dass die *Cx31* defizienten TS-Zellen eine reduzierte Proliferation und eine um 2 Tage verfrühte Differenzierung aufwiesen. Daraus wurde geschlossen, dass *Cx31* essentiell für die Aufrechterhaltung des Stammzellcharakters und für die Proliferationskapazität der TS-Zellen ist und der Verlust des *Cx31* Kanals somit zu einer verstärkten Differenzierung in Richtung der Trophoblast-Riesenzellen führt (Kibschull et al., 2004).

Diese Studien sind jedoch alle unter normoxischen Bedingungen (21% O<sub>2</sub>) durchgeführt worden, die den *in-vivo* Verhältnissen nicht entsprechen. Aus diesem Grunde sollte in der vorliegenden Arbeit der Einfluss der Hypoxie auf das Differenzierungsverhalten von WT TS-Zellen und *Cx31* defizienten TS-Zellen untersucht werden.

## **4.1 Der Einfluss von Hypoxie auf das Differenzierungsverhalten von WT und Cx31 defizienten TS-Zellen**

### **4.1.1 Hypoxie fördert in WT TS-Zellen die Differenzierung in Richtung des Spongiotrophoblasten und der Trophoblast-Riesenzellen**

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die WT TS-Zellen, die *in-vitro* in der Lage sind in alle Subpopulationen der Trophoblast-Stammzelllinie zu differenzieren (Tanaka et al., 1998), unter hypoxischen Bedingungen ein verändertes Differenzierungsverhalten aufweisen. So verloren die WT TS-Zellen unter Hypoxie vorzeitig ihr Stammzell-/Proliferationspotential und differenzierten verstärkt in Richtung des Spongiotrophoblasten und der Trophoblast-Riesenzellen. Die Ausbildung des labyrinthären Trophoblasten war dagegen geringfügig reprimiert. Diese Ergebnisse konnten anhand von Proliferationsstudien und der Expressionsanalyse von spezifischen Differenzierungsmarkern gewonnen werden. So zeigten die WT TS-Zellen, die unter Hypoxie kultiviert worden sind, vergleichend zu den normoxisch kultivierten WT TS-Zellen über den gesamten Differenzierungszeitraum eine verminderte Proliferation. Da das Proliferationsverhalten eng mit der Erhaltung des Stammzellpotentials bzw. der Anzahl an undifferenzierten Zellen einhergeht, wurden zusätzlich die Expressionen der frühen Stammzellmarker *Cdx2* und *Eomes*, die für die Entwicklung der frühen Trophoblastzelllinie essentiell sind (Chawengsaksophak et al., 1997; Russ et al., 2000) in undifferenzierten TS-Zellen analysiert. Über einen Zeitraum von 6h konnte unter normoxischen Bedingungen eine geringfügige Erhöhung der Expressionen der frühen Stammzellmarker beobachtet werden, während die Expressionen in den hypoxisch kultivierten Zellen dagegen relativ konstant blieben. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Normoxie die Anzahl der Stammzellen in einer Kultur fördert, während bei einer hypoxischen Kultivierung die Anzahl der Stammzellen auf dem geringen Ausgangswert bleibt. Hypoxie führt somit vermutlich zu einem früheren Verlust des Stammzellpotentials, welches möglicherweise der Grund für die reduzierte Proliferation und die antizipierte Differenzierung ist.

Dieses wurde durch die Versuche mit TS-Zellen, die über einen Zeitraum von 5 Tagen unter differenzierenden Bedingungen jeweils unter Normoxie oder Hypoxie kultiviert worden sind, bestätigt. Auch hier konnten in den normoxisch kultivierten Proben im undifferenzierten Zustand relativ hohe Expressionen von *Cdx2* und *Eomes* beobachtet werden, die dagegen in den Zellen, die unter Hypoxie inkubiert worden sind, signifikant reduziert waren. Die normoxisch kultivierten Zellen zeigten erst im Verlauf des Kultivierungszeitraumes eine Abnahme der *Cdx2* und der *Eomes* Expression, da die Zellen ihr Stammzellpotential verloren haben und in die Differenzierung eingetreten sind.

Der labyrinthäre Trophoblastmarker *Gcm1* wird während der Einfaltung des Chorionektoderms und der Einsprossung des allantoischen Mesoderms exprimiert und reguliert die Elongation der Trophoblastzellen, sowie die Fusion zum Synzytiotrophoblasten (Anson-Cartwright et al., 2000). *Gcm1* besitzt eine bedeutende Funktion bei der Ausbildung des Labyrinthes. So zeigen *Gcm1* defiziente Mäuse eine Hemmung der chorio-allantoischen Verzweigung, wodurch sich kein Labyrinth ausbilden kann und die Embryonen an Tag 10 pc absterben (Anson-Cartwright et al., 2000).

Der labyrinthäre Marker *Cx26* ist dagegen bereits im ausdifferenzierten Labyrinth lokalisiert, wo es die beiden Schichten des Synzytiotrophoblasten miteinander verbindet (Pauken et al., 1995; Gabriel et al., 1998). Dieser zeitliche Ablauf spiegelt sich in den vorliegenden Expressionsstudien wieder, da die *Gcm1* Expression innerhalb der ersten Tage des Differenzierungszeitraumes detektiert werden konnte, wogegen die *Cx26* Expression jedoch erst zum Ende des Kultivierungszeitraumes beobachtet worden ist. Dieses entspricht den Ergebnissen von Kibschull et al. (2004), der die Induktion der *Cx26* Expression auch erst ab Tag 3 der Differenzierung erfassen konnte. Die hypoxisch inkubierten WT Zellen zeigten einen ähnlichen zeitlichen Expressionsverlauf der labyrinthären Marker, jedoch war die Expressionsmenge vergleichend zu den unter Normoxie kultivierten Zellen weitaus geringer. Dieses verdeutlicht, dass Hypoxie zwar zu einem früheren Verlust des Stammzellpotentials der TS-Zellen führte, aber keine verfrühte Differenzierung in Richtung des Labyrinthes beobachtet werden konnte. Die Kultivierung unter Hypoxie führte sogar zur geringfügigen Reprimierung der labyrinthären Trophoblastmarker.

Der Marker für den proliferierenden, diploiden Trophoblasten des Ektoplazentarkonus und seines Derivates, dem Spongiotrophoblasten, stellt *Mash2* dar (Hughes et al., 2004). In den normoxisch inkubierten Zellen wies *Mash2* an Tag 3 des Kultivierungszeitraumes sein Expressionsmaximum mit anschließender Abnahme auf. Diese Herunterregulation verdeutlicht den Verlust des proliferierenden Trophoblasten des Ektoplazentarkonus. In den hypoxisch kultivierten Zellen wurde das Expressionsmaximum bereits am ersten Tag der Kultur erreicht. Dieser veränderte Expressionsverlauf unterstützt den Befund, dass die proliferierenden Zellen des Ektoplazentarkonus unter Hypoxie eher ihr Stammzellpotential verlieren und somit vermutlich eher in die Zellen des Spongiotrophoblasten und der Trophoblast-Riesenzellen ausdifferenzieren (Hughes et al., 2004).

Den Expressionsstart des Spongiotrophoblastmarkers *Tpbpa* konnte Kibschull et al. (2004) erst ab Tag 5 - nach der Abnahme der *Mash2* Expression - beobachten. Dieser Expressionsverlauf wurde in der vorliegenden Arbeit nachvollzogen. Interessanterweise zeigte sich jedoch in den hypoxisch inkubierten Zellen an Tag 5 eine signifikante Steigerung der *Tpbpa* Transkripte. Dieses bestätigte unsere Vermutung, dass Hypoxie zu einer verstärkten Differenzierung in Richtung des Spongiotrophoblasten führt. Unterstützt wird

diese Theorie auch durch das Expressionsprofil von *Cx31*, welches im Spongiotrophoblasten der murinen Plazenta exprimiert wird (Plum et al., 2001), und ebenfalls in den hypoxisch kultivierten Zellen eine deutliche Expressionserhöhung zeigte.

Trophoblastriesenzellen sezernieren das plazentaspezifische Hormon *Pl-1*, welches die luteale Progesteronproduktion stimuliert und somit essentiell für den Erhalt einer Schwangerschaft ist (Talamantes und Ogren, 1988). In den normoxisch inkubierten Zellen konnte über den gesamten Differenzierungszeitraum nur eine minimale *Pl-1*-Expression beobachtet werden. Kibschull et al. (2004) konnte die *Pl-1*-Expression auch erst ab Tag 7 des Differenzierungszeitraumes detektierten, die anschließend dann bis zum Tag 13 kontinuierlich anstieg. In den unter Hypoxie kultivierten Zellen konnte bereits an den Tagen 1, 3 und 5 signifikante Erhöhungen der *Pl-1*-Transkriptmenge verzeichnet werden.

Der Transkriptionsfaktor *AP-2γ* erscheint in der murinen Entwicklung erstmals mit Beginn der Trophoblastzelldifferenzierung und bleibt bei fortschreitender Plazentaentwicklung in allen Zellen der Trophoblastlinie bestehen (Shi und Kellems, 1998). *AP-2γ* beeinflusst die Entwicklung der frühen Plazentaanlage. So sterben *AP-2γ* defiziente Mäuse an Tag 8.5 pc durch eine unvollständige Ausbildung der extraembryonalen Zelllinien und eine reduzierte Anzahl der invasiven Trophoblast-Riesenzellen an der fetalen-maternalen Grenze ab (Auman et al., 2002; Werling et al., 2002). In der reifen murinen Plazenta kann *AP-2γ* in den primären und sekundären Trophoblast-Riesenzellen detektiert werden und ist für die Entwicklung der Trophoblast-Riesenzellen anscheinend von Bedeutung (El-Hashash et al., 2005; Öztürk et al., 2006). In den vorliegenden Expressionsstudien wird *AP-2γ* als später Marker, der für die Ausbildung der TGCs verantwortlich ist, betrachtet. Hierbei konnte gezeigt werden, dass das Expressionsprofil von *AP-2γ* analog zu dem Expressionsprofil von *Pl-1* verläuft. Diese Profile weisen beide auf eine verstärkte Ausbildung der TGCs unter Hypoxie hin.

Interessanterweise wurden in den hypoxisch kultivierten Proben bereits ab Tag 1 eine signifikante Erhöhung der *AP-2γ* und der *Pl-1* Expressionen beobachtet, während die *Tpbpa*- bzw. die *Cx31*-Expressionen, die typisch für den Spongiotrophoblasten sind, erst ab Tag 3 bzw. Tag 5 des Differenzierungszeitraumes induziert wurden. Diese Expressionsprofile verdeutlichen, dass TGCs bereits vor der Bildung der Spongiotrophoblastzellen entstehen. Dieses kann dadurch zustande kommen, dass eine spontane Differenzierung der TGCs aus den Stammzellen stattfindet, ohne dass vorher die Phase des *Tpbpa* exprimierenden Spongiotrophoblasten durchlaufen wird. Weiterhin könnten die Trophoblast-Riesenzellen auch aus Vorläuferzellen des Spongiotrophoblasten gebildet werden, die kein *Tpbpa* exprimieren. So konnten Simmons et al. (2007) in der murinen Plazenta eine Reihe von Subpopulationen der TGCs identifizieren. Neben den TGCs, die an der Grenze der Implantationsstelle lokalisiert sind, wurden u.a. auch die Spiralarterien-assoziierten TGCs

(Adamson et al., 2002; Cross et al., 2002; Hemberger et al., 2003), die maternalen Blutkanal-assoziierten TGCs und die TGCs, die innerhalb der sinusoidalen Räume des Labyrinthes lokalisiert sind (Simmons et al., 2007), ausgemacht. Diese verschiedenen Subtypen der TGCs, die sich anhand ihrer Morphologie und ihres Expressionsmusters unterscheiden, konnten auch alle in differenzierenden TS - Zellkulturen nachgewiesen werden (Simmons et al., 2007). Es konnte gezeigt werden, dass eine Reihe dieser TGC-Subtypen aus Vorläuferzellen gebildet werden, die keine *Tpbpa*-Expression aufweisen. Diese Vorläuferzellen sind speziell in der Chorionplatte und im inneren Bereich des Ektoplazentarkonus lokalisiert worden (Simmons et al., 2007). Da auch gezeigt werden konnte, dass Retinsäure speziell die Ausbildung von TGCs, die an der maternalen-fetalen Grenze lokalisiert sind, fördert, ohne dass vorher eine *Tpbpa*+ Vorläuferzelle durchlaufen wird (Yan et al., 2001), kann vermutet werden, dass die hypoxische Umgebung am Anfang des Differenzierungszeitraumes ebenfalls einen speziellen Subtypen der TGCs fördert, der nicht aus *Tpbpa*+ Vorläuferzellen gebildet wird.

Das Hypoxie in einer Zellkultur zu einer erhöhten Anzahl der TGCs führt, konnte auch durch eine Zellzählung bestätigt werden. Dabei korrelierte das Auftreten der TGCs in der hypoxisch kultivierten Zellkultur mit dem Expressionsverlauf von *PL-1*. So war die *PL-1* Expression ab Tag 1 unter Hypoxie signifikant erhöht und erreichte am 5.Tag das Expressionsmaximum - zu einem Zeitpunkt ab dem auch deutliche Unterschiede in der TGC-Anzahl zwischen den unterschiedlich kultivierten Zellen in der Kultur beobachtet werden konnten. Interessanterweise wurden TGCs aber auch während der frühen Phase des Differenzierungszeitraumes in den Kulturen beobachtet, die unter Normoxie kultiviert worden sind, obwohl hier die *PL-1*-Expression erst am Ende des Differenzierungszeitraumes detektiert worden ist. Eine Ursache könnte hier auch wieder die Ausbildung von TGCs sein, die kein *PL-1* exprimieren. Zu diesen TGCs gehören z.B. die Spiralarterien-assoziierten TGCs oder die maternal-Blutkanal assoziierten TGCs (Simmons et al., 2007). TGCs sind große, polyploide Zellen, die durch Endoreduplikation entstehen (Gardner und Davies, 1993; MacAuley et al., 1998). So können sie DNA Gehalte bis zu dem 1000fachen des haploiden Genoms aufweisen (Zybina, 1970; Zybina und Grishchenko, 1970; Barlow und Sherman, 1972; Hoffman und Wooding, 1993). TGCs exprimieren nur im ausdifferenziertem Zustand *PL-1* (Wiemers et al., 2003), d.h. es müssen gewisse Gene zur Induzierung (Karin et al., 1990; Ingraham et al., 1990) oder eventuell auch ein gewisser DNA Gehalt in der Zelle vorliegen, bevor die *PL-1* Transkription beginnen kann. Somit könnten die unter Normoxie beobachteten TGCs zwar schon die Struktur der TGCs gezeigt haben, waren aber jedoch noch nicht so weit ausdifferenziert, dass sie in der Lage waren *PL-1* zu exprimieren.

Weiterhin wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob die erhöhte Anzahl der TGCs mit einer Vergrößerung der Zellen einhergeht. Dabei wurde beobachtet, dass eine starke

Ausdehnung der Zellgröße zwischen den Tagen 3 und 5 stattfand, es jedoch keinen Unterschied zwischen den Kulturen gab, die unter normoxischen bzw. hypoxischen Bedingungen kultiviert worden sind.

Die verstärkte Differenzierung in Richtung des Spongiotrophoblasten und der TGCs, die bei hypoxisch kultivierten TS-Zellen beobachtet werden konnte, war unabhängig von den Kultivierungsbedingungen. Es war irrelevant, ob die Zellen nach dem Auftauen erstmals in Stammzellmedium unter Normoxie kultiviert und anschließend nur für die Differenzierungsreihe in eine hypoxische Umgebung überführt worden sind, oder ob sie direkt nach dem Auftauen unter Hypoxie inkubiert worden sind. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass die Zellen nur kurzzeitig im undifferenzierten Zustand durch die Hypoxie angeregt werden müssen, um ein reduzierteres Stammzellpotential aufzuweisen und um anschließend während der Differenzierungsphase verfrüht in die Differenzierung in Richtung des invasiven Phänotyps der TGCs einzutreten.

Wie bereits erwähnt worden ist, wurde der Einfluss der Hypoxie auf das Differenzierungsverhalten bzw. das Migrations- und Inversionsverhalten der Plazenta in einigen vorherigen Studien analysiert und ist in der Literatur gegensätzlich dargestellt.

Einige Studien zeigen, dass ein niedriger Sauerstoffgehalt die Invasion des Trophoblasten in das maternale Gewebe fördert, was mit dem Verlust der Proliferation und einer stärkeren Ausbildung der TGCs verbunden ist (Graham et al., 2000; Hayashi et al., 2005; Robins et al., 2007). In anderen Studien konnte dagegen gezeigt werden, dass niedrige Sauerstoffbedingungen den invasiven Phänotyp inhibieren (Genbacev et al., 1997; Caniggia et al., 2000; Takeda et al., 2007; Gultice et al., 2009).

Es gibt verschiedene Ansätze in der Literatur, dieses unterschiedliche Differenzierungs- und Migrationsverhalten unter hypoxischen Bedingungen zu erklären. Lash et al. (2007) untersuchten den Einfluss der Hypoxie auf die Invasivität von unterschiedlichen Trophoblastzelllinien. So konnten sie beobachten, dass z.B. die Zytotrophoblastzelllinie HTR-8/Svneo und die humane Chorionkarzinomzelllinie JEG3 nach einer 3%-igen Sauerstoffinkubation nach 24h eine erhöhte Invasivität zeigten, die nach 72h aber wieder inhibiert worden ist. Die humane Zytotrophoblastzelllinie SGHPL-4 dagegen zeigte nach 24h in 3% O<sub>2</sub> eine reduzierte Invasivität, während die Chorionkarzinomzelllinie JAR überhaupt keine Beeinflussung durch den Sauerstoffgehalt aufwies. Die Reaktion auf eine hypoxische Umgebung scheint ein sehr zellspezifischer Vorgang zu sein. Experimente mit nur einer Trophoblastzelllinie haben somit nur bedingt eine allgemeine Aussagekraft (Lash et al., 2007). Auch die verschiedenen Kultivierungsbedingungen unter denen die Versuche durchgeführt worden sind, werden vermutlich einen Einfluss auf das unterschiedliche

Differenzierungsverhalten der Zellen gehabt haben. So wurden die oben genannten Studien z.B. unter verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen durchgeführt (1-3%). Gultice et al. (2009) konnten zeigen, dass verschiedene Sauerstoffkonzentrationen die Trophoblastdifferenzierung unterschiedlich beeinflussen. Eine Inkubation der Rcho-1 Trophoblastzelllinie bei 3% O<sub>2</sub> führte z.B. zur Inhibierung der Differenzierung, während bei höheren Sauerstoffkonzentrationen (5% und 8%) ein verstärkter Differenzierungsprozess beobachtet werden konnte.

#### **4.1.2 Einfluss der HIF-Proteine auf den unter Hypoxie beobachteten Differenzierungsprozess in WT TS-Zellen**

Es wurde untersucht, ob HIF-1 $\alpha$  der Faktor ist, der die unter Hypoxie beobachtete vorgezogene Differenzierung in Richtung des Spongiotrophoblasten bzw. der Trophoblast-Riesenzellen in WT TS-Zellen vermittelt. HIF-1 $\alpha$  gehört zur Familie der HIF-Transkriptionsfaktoren und setzt sich aus einem Heterodimer von einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ - (ARNT-Komplex) Untereinheit zusammen (Bardos et al., 2005; Semenza et al., 2007). Bisher sind drei verschiedene Isoformen des HIF- $\alpha$  Proteins bekannt: HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$ , HIF-3 $\alpha$ . Die mRNA von HIF-1 $\alpha$  wird in der Zelle konstitutiv exprimiert. Dieses konnte auch in WT TS-Zellen nachvollzogen werden, da sowohl in undifferenzierten TS-Zellen, als auch in differenzierenden TS-Zellen eine HIF-1 $\alpha$  Expression detektiert werden konnte, die unabhängig von der umgebenden Sauerstoffkonzentration war. Die Regulation von HIF-1 $\alpha$  erfolgt auf der Proteinebene. Unter normoxischen Bedingungen wird das Protein durch die Prolylhydroxylasen (PHDs) hydroxyliert, wodurch es zu einer Interaktion mit dem von-Hippel-Lindau-Tumorsuppressorprotein (pVHL) kommt. Das pVHL beinhaltet eine Ubiquitinligase, welche die Ubiquitinierung von HIF-1 $\alpha$  vollzieht und das Protein somit von den Proteasomen abgebaut werden kann (Salceda et al., 1997; Maxwell et al., 1999;). Unter hypoxischen Bedingungen dagegen wird HIF-1 $\alpha$  stabilisiert, dimerisiert mit dem ARNT-Komplex und induziert die jeweiligen Zielgene (Fandrey et al., 2006). Diese Stabilisierung des HIF-1 $\alpha$  Proteins unter hypoxischen Bedingungen konnte in undifferenzierten TS-Zellen ebenfalls nachvollzogen werden. Interessanterweise wurde aber im Verlaufe des Differenzierungsprozesses sowohl in den normoxisch, als auch in den hypoxisch inkubierten Zellen ein Abbau des HIF-1 $\alpha$  Proteins beobachtet. Während der Differenzierung der TS-Zellen beeinflussen somit wohl neben der Sauerstoffkonzentration noch weitere Faktoren die Stabilisierung des HIF-1 $\alpha$  Proteins und induzieren wie in diesem Falle den Proteinabbau. Dimethyloxaloylglycin (DMOG) ist ein Inhibitor der Prolylhydroxylasen. Es verhindert die Hydroxylierung des HIF-1 $\alpha$  Proteins und damit den proteasomalen Abbau. Mit DMOG kann somit auch unter normoxischen Bedingungen eine hypoxische Umgebung simuliert werden. In undifferenzierten WT TS-Zellen konnten alle drei Prolylhydroxylasen, die in der Lage sind,

das HIF-1 $\alpha$  Protein zu hydroxylieren, nachgewiesen werden. Von den Prolylhydroxylasen ist vermutlich jedoch nur das PHD2 das für die Plazentaentwicklung entscheidende Protein. So weisen defiziente *PHD2* Mäuse eine embryonale Letalität zwischen den Tagen E12.5 und E14.5 auf, wogegen *PHD1* und *PHD3* Knockout Mäuse lebensfähig sind (Takeda et al., 2006, Takeda et al., 2008).

Die Zugabe von DMOG induzierte bei den Zellen einen vergleichbaren Differenzierungsverlauf, wie der, der unter Hypoxie beobachtet werden konnte. So zeigten die Zellen, die mit DMOG versetzt worden sind, ebenfalls bereits im undifferenzierten Zustand eine erniedrigte *Eomes* - Expression, während die Expressionen von *Tpbpa*, *AP-2 $\gamma$*  und *Pl-1* im Laufe der Differenzierung signifikant erhöht waren. Diese vergleichbare Expressionsprofile lassen darauf schließen, dass die beobachteten Differenzierungsvorgänge über HIF-1 $\alpha$  vermittelt werden könnten. DMOG ist jedoch ein allgemeiner Inhibitor der Prolylhydroxylasen PHD1-3, die sowohl HIF-1 $\alpha$ , als auch HIF-2 $\alpha$  hydroxylieren können (Fandrey et al., 2006). Mit diesem Versuch kann also nicht ausgeschlossen werden, dass die hier beobachteten Differenzierungsvorgänge auch über HIF-2 $\alpha$  vermittelt werden könnten. Cowden Dahl et al. (2005) generierten *Hif1 $\alpha$*  defiziente, als auch *Hif2 $\alpha$*  defiziente Mäuse. Die *Hif1 $\alpha$*  defizienten Plazenten wiesen einen reduzierten Spongiotrophoblasten und eine geringere Anzahl an fetalen Blutgefäßen in der Plazenta auf, während die *Hif2 $\alpha$*  defizienten Plazenten dagegen normal erschienen und vergleichbar mit den WT Plazenten waren (Cowden Dahl et al., 2005). Aufgrund dieser Phänotypen kann vermutet werden, dass HIF-1 $\alpha$  die Differenzierung der murinen Plazenta reguliert. Diese Vermutung korreliert mit Maltepe et al. (2005), die in undifferenzierten TS-Zellen *Hif1 $\alpha$* , aber keine *Hif2 $\alpha$*  mRNA detektieren konnten. Erst im Verlaufe der Differenzierung der TS-Zellen konnten auch *Hif2 $\alpha$*  Transkripte beobachtet werden. Harvey et al. (2004) konnte dagegen in bovinen Blastozysten kein HIF-1 $\alpha$  Protein detektieren, während HIF-2 $\alpha$  im Nukleus der bovinen Blastozyste lokalisiert war. Auch Takeda et al. (2006) zeigte, dass die in Rcho-1 Zellen durch Hypoxie beeinflusste Differenzierung unabhängig vom HIF-1 $\alpha$  Protein ist.

Ob nun HIF-1 $\alpha$  oder HIF-2 $\alpha$  der Faktor ist, der die verstärkte Differenzierung der WT TS-Zellen in Richtung des Spongiotrophoblasten und der Trophoblast-Riesenzellen bei gleichzeitiger Reprimierung des labyrinthären Trophoblasten unter Hypoxie vermittelt, könnte mittels siRNA-Versuche für *Hif1 $\alpha$*  bzw. *Hif2 $\alpha$*  genauer untersucht werden. Eventuell wird dieser Prozess sogar durch beide Faktoren beeinflusst oder ist gänzlich unabhängig von den HIF- $\alpha$  Proteinen.

Cowden Dahl et al. (2005) generierten jedoch *Hif1 $\alpha$ <sup>-/-</sup> Hif2 $\alpha$ <sup>-/-</sup>* TS Zellen, die nur noch eine rudimentäre Expression des Spongiotrophoblastmarkers *Tpbpa* und des TGC-Markers *Pl-1* zeigten, dafür aber verstärkt in die Zellen des Synzytiotrophoblasten differenzierten. Diese



Ergebnisse korrelieren mit den Ergebnissen aus der vorliegenden Arbeit und lassen einen Einfluss des HIF- $\alpha$ /ARNT- Komplex bei den hier beobachteten Differenzierungsvorgängen unter Hypoxie vermuten. Auch etablierte *Arnt*<sup>-/-</sup> TS-Zellen bildeten unter differenzierenden Bedingungen vermehrt Zellen des Synzytiotrophoblasten, während die Zellen des Spongiotrophoblasten und die Trophoblast-Riesenzellen nicht in der Kultur beobachtet werden konnten (Fryer und Simon; 2006). Weiterhin konnte dargestellt werden, dass die *Hif1 $\alpha$* <sup>-/-</sup> *Hif2 $\alpha$* <sup>-/-</sup> TS-Zellen, genauso wie die *Arnt*<sup>-/-</sup> TS-Zellen nur noch ein reduziertes Migrationsverhalten aufwiesen (Fryer und Simon; 2006). Interessanterweise zeigten die *Hif1 $\alpha$* <sup>-/-</sup> *Hif2 $\alpha$* <sup>-/-</sup> Plazenten, wie auch die *Arnt*<sup>-/-</sup> Plazenten neben einen reduzierten Spongiotrophoblasten, jedoch eine erhöhte Anzahl an TGCs und ein nicht vollständig ausdifferenziertes Labyrinth (Cowden Dahl et al., 2005; Fryer und Simon, 2006). Aufgrund des *in-vivo* Phänotyps postulierte Cowden Dahl et al. (2005), dass die HIF- $\alpha$  Proteine die Differenzierung in Richtung des Spongiotrophoblasten fördern, wogegen die Differenzierung in den labyrinthären Trophoblasten und in die TGCs gehemmt wird.

In der vorliegenden Arbeit wurde aber während der Differenzierung eine vermehrte Anzahl an TGCs in der hypoxisch inkubierten Kultur beobachtet. Zeitgleich konnte aber eine Degradation des HIF-1 $\alpha$  Proteins detektiert werden, was dazu geführt haben könnte, dass die Reprimierung der TGCs aufgehoben wird, und die Spongiotrophoblastzelllinie dann weiter in die TGCs ausdifferenziert.

Auch der Phänotyp der *Phd2*<sup>-/-</sup> Mäuse korreliert mit den Ergebnissen aus der vorliegenden Arbeit. In *Phd2* defizienten Mäusen können die HIF- $\alpha$  Proteine unter normoxischen Bedingungen nicht mehr hydroxyliert und abgebaut werden, was zu einer erhöhten Akkumulation der HIF- $\alpha$  Proteine in der Plazenta führt (Takeda et al., 2006). Die *Phd2*<sup>-/-</sup> Mäuse weisen ein reduziertes Labyrinth auf, das vom Spongiotrophoblasten durchsetzt wird und eine anormalen Verteilung der TGCs. Dieser Phänotyp führt zwischen den Tagen E12.5 und E14.5 zum Tode der Embryonen (Takeda et al., 2006).

#### **4.1.3 Cx31 KO TS-Zellen zeigen einen Verlust der Hypoxie-bedingten Förderung des Spongiotrophoblasten und der Trophoblast-Riesenzellen**

Kibschull et al. (2004) etablierten *Cx31*<sup>-/-</sup> TS-Zellen. Anhand von untersuchten Markergenen und Connexinen konnte gezeigt werden, dass diese TS-Zellen ein um etwa zwei Tage verschobenes Expressionsmuster in Richtung einer beschleunigten Differenzierung entlang der Trophoblastzelllinie aufwiesen. Außerdem verloren die *Cx31*<sup>-/-</sup> TS-Zellen mit Einsetzen der Differenzierung ihre proliferative Aktivität. Dieser Phänotyp der *Cx31* defizienten TS-Zellen ähnelt dem Phänotyp der WT TS-Zellen, die unter Hypoxie kultiviert worden sind.

Die vorliegende Arbeit zeigte nun, dass Hypoxie bei den *Cx31* defizienten TS-Zellen zu keinen synergistischen Effekten führte. Die hypoxisch kultivierten *Cx31*<sup>-/-</sup> TS-Zellen zeigten vergleichend zu den normoxisch kultivierten *Cx31*<sup>-/-</sup> TS-Zellen zwar auch eine verfrühte Differenzierung und eine geringfügige Reprimierung des labyrinthären Trophoblasten, jedoch war die Differenzierung in Richtung des Spongiotrophoblasten und der TGCs gestört. So konnten in den hypoxisch inkubierten *Cx31*<sup>-/-</sup> TS-Zellen nur noch geringfügig *Tpbpa* exprimierende Zellen detektiert werden, während TGCs noch weiterhin in der Kultur beobachtet werden konnten. Deren Anzahl war jedoch nun vergleichbar mit der Anzahl der TGCs aus den normoxisch kultivierten *Cx31*<sup>-/-</sup> TS-Zellkulturen. Dieses weist auf eine Spontandifferenzierung der Stammzellen zu den Trophoblast-Riesenzellen hin.

Anhand von Proliferationsstudien konnten Kibschull et al. (2004) zeigen, dass *Cx31* defiziente TS-Zellen im Vergleich zu WT TS-Zellen eine reduzierte Proliferation aufweisen. In den hier vorliegenden Proliferationsstudien konnte jedoch keine reduzierte, sondern nur eine verzögerte Proliferation beobachtet werden. Eine hypoxische Inkubation wirkte sich aber auch bei den *Cx31* defizienten TS-Zellen durch ein vermindertes Proliferationspotential aus. Hypoxie führt also generell zu einer Reduktion des Proliferationsvermögens einer TS-Zellkultur. Diese Reduktion des Proliferationspotentials konnte aber nicht zusätzlich durch den Verlust des *Cx31* Kanals gesteigert werden.

Auch das Expressionsprofil der Stammzellmarker *Cdx2* und *Eomes* war in *Cx31* defizienten Zellen vergleichbar mit dem von WT TS-Zellen. Auch hier konnte bereits im undifferenzierten Zustand unter Hypoxie eine signifikante Verringerung der Transkripte beobachtet werden. Dieses verdeutlicht, dass das Expressionsprofil der Stammzellmarker *Cdx2* und *Eomes* also unabhängig vom *Cx31* Kanal ist und eine hypoxische Inkubation sich somit generell mit einer Reduktion des Stammzellpotentials auswirkt.

Dass der Verlust des *Cx31* Proteins in den ganz frühen Stadien der Embryonalentwicklung generell keinen Einfluss auf das Differenzierungsverhalten der Trophoblastzelllinie hat, konnte auch anhand von *Cx31* defizienten Mäusen gezeigt werden. So implantieren *Cx31* defiziente Mäuse erfolgreich, was auf eine normale präimplantative Entwicklung schließen lässt (Kidder et al., 2001; Söhl et al., 2004). Auch Präimplantationsembryonen, die mit dem Gap Junction Inhibitor 18alpha-Glycyrrhetinic-Säure versetzt worden sind, weisen eine normale Entwicklung der Blastozyste auf. Dieses zeigt an, dass die interzelluläre Kommunikation durch Gap Junction Proteine für die murine Präimplantationsentwicklung nicht essentiell ist (Vance et al., 1999).

Kibschull et al. (2004) konnten zeigen, dass *Mash2* der früheste Marker zu Beginn der Differenzierung war, der in *Cx31* defizienten TS-Zellen eine Expressionsveränderung

aufwies. Diese frühe Fehlregulierung zu Beginn der Differenzierung führte zu der nachfolgenden Verschiebung der Expressionen von *Cx26*, *Gcm1*, *Tpbpa* und *Pl-1*.

Diese Veränderungen in dem Expressionsmuster konnten in der vorliegenden Arbeit unter normoxischen Bedingungen nachvollzogen werden. Interessanterweise induzierte Hypoxie bei den labyrinthären Marker *Gcm1* und *Cx26*, sowie bei dem Marker für den proliferierenden, diploiden Trophoblasten des Ektoplazentarkonus *Mash2* in *Cx31* defizienten TS-Zellen Reaktionen, die vergleichbar waren mit den Reaktionen der jeweiligen Markern unter Hypoxie in WT TS-Zellen. So wurde ebenfalls bei der *Gcm1* Expression kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden unterschiedlich inkubierten Proben beobachtet, während *Cx26* ein reduziertes Expressionsprofil und *Mash2* eine frühere Expressionserniedrigung in den hypoxisch kultivierten Zellen zeigte. Der Verlust des *Cx31* Gens beeinflusst unter Hypoxie also weder die Expressionen der frühen Marker *Cdx2* und *Eomes*, noch die Expressionen von *Mash2* und den labyrinthären Marker *Gcm1* und *Cx26*. Erste Expressionsänderungen, die durch den Verlust des *Cx31* beobachtet werden konnten, wiesen unter Hypoxie der Spongiotrophoblastmarker *Tpbpa*, als auch die Marker für die TGCs *AP-2γ* und *Pl-1* auf.

So konnte unter Hypoxie in *Cx31* defizienten TS-Zellen keine erhöhte Expression von *Tpbpa* mehr verzeichnet werden. Die beim WT unter Hypoxie stattfindende verstärkte Differenzierung in Richtung des Spongiotrophoblasten konnte hier also nicht mehr beobachtet werden.

Interessanterweise zeigten die *Cx31* defizienten TS-Zellen, die sowohl unter Normoxie, als auch unter Hypoxie kultiviert worden sind, eine generelle Reduktion der *AP-2γ* Expression. Wie bereits erwähnt, wird für *AP-2γ* eine Rolle bei der Förderung der TGCs angenommen, da *AP-2γ* defiziente Embryonen weniger invasiv sind und eine reduzierte Anzahl von TGCs aufweisen (Auman et al., 2002; Werling et al., 2002). Der Verlust der *AP-2γ* Expression könnte in den *Cx31* defizienten TS-Zellen die Ursache dafür sein, dass die Trophoblast-Riesenzellen nicht mehr verstärkt ausgebildet werden können. Es stellt sich nun die Frage warum der Transkriptionsfaktor *AP-2γ* durch den Verlust des *Cx31* Kanalproteins runterreguliert wird. *AP-2γ* wird während der ganzen Schwangerschaft im Trophoblasten exprimiert und das Deletieren des Gens in der Maus führt zu einem frühen Tod der Embryonen (E8.5). Dieser Phänotyp ist durch eine Reduktion der Trophoblastproliferation mit der Folge einer nicht ausdifferenzierten Plazenta begründet (Wering und Schorle, 2002). Interessanterweise zeigt die *Cx31* Knock-out Maus einen ähnlichen Phänotyp, der darauf beruht, dass bei Fehlen dieses Kommunikationskanals die Trophoblastproliferation reduziert ist und sich keine adäquate Differenzierung in andere Subpopulationen des Trophoblasten zeigt (Kibschull et al., 2004). Diese Ähnlichkeiten haben zu einer Kooperation mit der Gruppe von Prof. Schorle, Universität Bonn, geführt. Bei dieser Zusammenarbeit soll untersucht

werden, inwieweit *AP-2γ* und *Cx31* funktionell und biochemisch in Zusammenhang stehen und eventuell synergistisch die Proliferationskapazität der Trophoblast-Stammzellen beeinflussen. Die in der hier vorliegenden Arbeit beobachtete Runterregulierung des *AP-2γ* in den *Cx31* defizienten TS-Zellen lässt auf einen Zusammenhang vermuten. In vorherigen Arbeiten konnte z.B. gezeigt werden, dass *AP-2γ* in *Rcho-1*-Zellen zu einer Repression der *Cx31* Promotoraktivität führt, während in der Maus-Keratinozytenzelllinie Hel-37 eine Erhöhung der Promotoraktivität beobachtet werden konnte (Janot et al., 2003). *AP-2γ* könnte somit an einer zellspezifischen Regulation der *Cx31* Expression beteiligt sein. In den hier dargestellten Expressionsstudien konnte nun aber eine Erniedrigung des *AP-2γ* Transkriptes durch den Verlust des *Cx31* Kanals beobachtet werden. Das weist darauf hin, dass *AP-2γ* „downstream“ vom *Cx31* Gen agiert. Das bedeutet, dass *Cx31* und *AP-2γ* in einem Netzwerk involviert sind, die für den Proliferations- und Differenzierungsprozess in der Plazenta verantwortlich sind. Der Verlust des *Cx31* Kanals führt somit zu einer Störung dieser Signalkaskade, was dazu führen kann, dass die Expression von *AP-2γ* reprimiert wird. Es muss jedoch darauf hingewiesen werden, dass teilweise sehr unterschiedliche *AP-2γ* Expressionen in TS-Zellen beobachtet werden konnten. So wurden einige *Cx31* defiziente TS-Zellklone detektiert, die im Vergleich zu WT TS-Zellen einer Erhöhung der *AP-2γ* Expression aufwiesen. Dieses lässt darauf schließen, dass neben dem Verlust des *Cx31* Kanals auch noch eine Reihe von anderen Faktoren einen Einfluss auf die *AP-2γ* Expression nehmen könnten. Weitere Aufschlüsse über den funktionellen und biochemischen Zusammenhang zwischen *AP-2γ* und *Cx31* könnte die Etablierung von *AP-2γ* knock-out TS-Zellen liefern. Leider ist es jedoch bisher nicht möglich gewesen aus *AP-2γ* defizienten Blastozysten TS-Zellen zu generieren und auch die Anwendung der Cre-Rekombinase mit Hilfe eines membranpermeablen Cre-Proteins an konditionalen *AP-2γ* Allelen führte zu keinen stabilen TS-Zellklonen. Die Transfektion der TS-Zellen mit einem induzierbaren Cre-Gens in Zusammenhang mit konditionalen *AP-2γ* Allelen, brachte bisher auch keine Erfolge (Buhl et al., 2008).

In den *Cx31* defizienten TS-Zellen wurden unter hypoxischen wie auch unter normoxischen Bedingungen ähnliche Expressionshöhen von *Pl-1* und eine vergleichbare Anzahl an TGCs in der Kultur beobachtet. Diese ähnlichen *Pl-1* Expressionslevel und die vergleichbare Anzahl an TGCs resultieren vermutlich daraus, dass kein Stammzellreservoir der TS-Zellkulturen mehr vorhanden war. Da nämlich auch die *Cx31* defizienten TS-Zellen verfrüht in Richtung der TGCs ausdifferenzieren, konnte kein Unterschied mehr in der *Pl-1*-Expression zu späteren Zeitpunkten unter Hypoxie detektiert werden. Da gezeigt werden konnte, dass *Tpbpa* in den hypoxisch inkubierten Zellen an den späteren Differenzierungstagen vergleichend zu den normoxisch inkubierten Zellen eine reduzierte

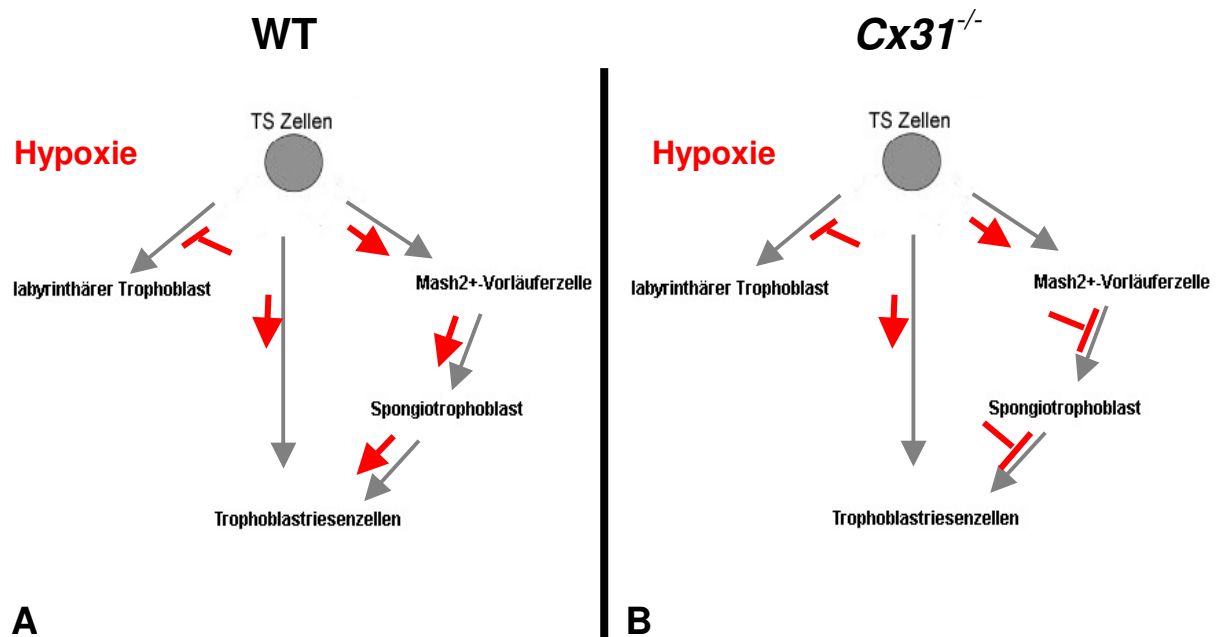
Expression aufwies, kann vermutet werden, dass in den *Cx31* defizienten TS-Zellen unter Hypoxie die Phase des Spongiotrophoblasten umgangen wird. Dieses bedeutet, dass hier eventuell eine spontane Direktendifferenzierung der Stammzellen in die Trophoblast-Riesenzellen stattgefunden hat. Diese Ergebnisse korrelieren mit dem Phänotyp der *Cx31* defizienten Mäuse, die ebenfalls eine Reduktion des Spongiotrophoblasten und eine verstärkte Entwicklung der TGCs aufweisen (Plum et al., 2001). Kibschull et al. (2004) führte diesen Phänotyp darauf zurück, dass der Verlust des *Cx31* Kanals zu einem gestörten Gleichgewicht zwischen Proliferation und Differenzierung, welches zugunsten einer verstärkten Differenzierung verschoben ist, führt. Es muss jedoch bedacht werden, dass die Entwicklung der *Cx31* defizienten Plazenten in den frühen Stadien der Embryonalentwicklung ebenfalls unter Hypoxie stattfindet. Diese hypoxische Umgebung beeinflusst zusätzlich die Proliferations- und Differenzierungsvorgänge in den *Cx31* defizienten Plazenten, welches dann vermutlich zur Direktendifferenzierung der Stammzellen der Plazenta in die Trophoblast-Riesenzellen unter Umgehung des Spongiotrophoblasten führt. Auch *Mash2*-defiziente Embryonen weisen einen Verlust des Spongiotrophoblasten sowie eine erhöhte Anzahl von Trophoblast-Riesenzellen auf (Guillemot et al., 1994). Aus diesem Grunde wurde ein Zusammenspiel von *Cx31* und *Mash2* innerhalb der gleichen Signalkaskade diskutiert (Plum et al., 2001). Inwieweit Hypoxie bei dem *Mash2* defizienten Phänotyp eine Rolle spielt, muss jedoch noch untersucht werden. Eine Beeinflussung des *Mash2* durch Hypoxie bzw. dem HIF- $\alpha$ /ARNT-Komplex konnten aber Freyer und Simon (2006) anhand von *Arnt*<sup>-/-</sup> TS-Zellen zeigen. So wiesen die *Arnt*<sup>-/-</sup> TS-Zellen eine stark reduzierte *Mash2*-Expression auf.

Der Verlust des *Cx31* Kanals resultiert in einer transienten plazentaren Dysmorphogenese, die zum Absterben von 60% der Embryonen *in utero* zwischen den Tagen 10.5 pc und 13.5 pc führt. Bei 40% der Embryonen wurde eine Regeneration der plazentaren Entwicklung und Funktion beobachtet, die zum Überleben führt. Es wurde vermutet, dass das im Spongiotrophoblasten an Tag E10.5 induzierte *Cx43* den Verlust des *Cx31*-Kanals kompensieren kann, was dann zum Wiedereinsetzen der Differenzierungsprozesse führt (Plum et al., 2001). Die Generierung einer *Cx31/Cx43*- Doppelknockout Maus (Kibschull et al., 2005) zeigte jedoch, dass die zusätzliche Inaktivierung des *Cx43* Gens zu keinem sich von der *Cx31* Knockout Maus unterscheidenden plazentaren Phänotyp führte. Somit konnte die Induktion von *Cx43* im Spongiotrophoblasten der *Cx31* defizienten Plazenta nicht für deren Regeneration und für das Überleben von 40% der Embryonen verantwortlich sein (Kibschull et al., 2005). Es wird nun spekuliert, dass *Cx31.1* die Funktion von *Cx31* in der Plazenta partiell kompensieren kann. Die Plazenten der *Cx31.1* defizienten Mäuse weisen vergleichend zum WT eine kompaktere Struktur des Spongiotrophoblasten und ein fehlentwickeltes Labyrinth auf, welches einen sehr dichten Aufbau und reduzierte

Zwischenräume, die mit maternalen Blut gefüllt sind, besitzt. Dieser Phänotyp führt jedoch nur zum Tod von 30% der Embryonen zwischen den Tagen E11.5 und E14.5 ist somit moderater als der *Cx31* defiziente Phänotyp (Zheng-Fischöfer et al., 2007). *Cx31* und *Cx31.1*, deren Proteinstruktur eine 68%-ige Übereinstimmung der Aminosäuresequenz zeigt, sind beide auf dem Maus-Chromosom 4 in unmittelbarer Nähe lokalisiert und werden in vielen Geweben coexprimiert (Hennemann et al., 1992). Dieses lässt redundante Funktionen vermuten und erklärt den nur teilweise auftretenden Tod der *Cx31* bzw *Cx31.1* defizienten Embryonen. Doppelknockout Mäuse die Aufschluss über diese Theorie geben könnten, sind leider noch nicht generiert worden (Kibschull et al., 2008).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Hypoxie einen wesentlichen Einfluss auf das Differenzierungsverhalten von WT als auch von *Cx31* defizienten TS-Zellen besitzt. So führt der Verlust des *Cx31* Gens unter Hypoxie zu einer Direkt Differenzierung der Stammzellen in die Trophoblast-Riesenzellen unter Umgehung des Spongiotrophoblasten. Es könnte nun sein, dass die 40% überlebende Embryonen auch daraus resultieren, dass die Plazenta zwischen den Tagen 10.5 pc und 13.5 pc wieder einen erhöhten O<sub>2</sub>-Gehalt aufweist, da die Plazenta Verbindungen an das maternale Blutsystem aufgebaut hat. Diese erhöhte Sauerstoffkonzentration würde die Proliferation der Stammzellen in den Plazenten wieder fördern und somit zur Regeneration der *Cx31* defizienten Plazenten führen.

Abb. 4.1 gibt einen schematischen Überblick über den Einfluss von Hypoxie auf das Differenzierungsverhalten von WT und *Cx31* defizienten TS-Zellen.



**Abb. 4.1: Einfluss von Hypoxie auf das Differenzierungsverhalten von WT und  $Cx31^{-/-}$  TS-Zellen**  
**A.** Hypoxie fördert in WT TS-Zellen die Differenzierung in Richtung des Spongiotrophoblasten und der Trophoblast-Riesenzellen. Die Differenzierung in den labyrinthären Trophoblasten wird reprimiert. **B.** In  $Cx31^{-/-}$  TS-Zellen wird der Differenzierungsweg in Richtung des labyrinthären Trophoblasten ebenfalls reprimiert. Die Zellen des Spongiotrophoblasten werden nicht mehr verstärkt ausgebildet, während weiterhin jedoch TGCs in der Kultur beobachtet werden konnten. Eine Direktendifferenzierung der Stammzellen in die TGCs wird vermutet (modifiziert nach Cowden Dahl et al., 2005).

#### 4.2 Die Phänotypanalyse der $Cx31F137L$ punktmutierten Plazenta

Schnichels et al. (2007) generierten Mäuse, die heterozygot im  $Cx31$  Gen eine Punktmutation an der Aminosäureposition 137 aufwiesen und als Modell für die humane Hautkrankheit *Erythrokeratoderma variabilis* (EKV) dienten. Durch diese Punktmutation erfolgte ein Austausch von Phenylalanin (F) gegen ein lipophiles Leucin (L).

Es konnte gezeigt werden, dass die homozygoten  $Cx31F137L/F137L$  Mäuse direkt nach der Implantation am Tag E7.5 absterben. Da zu diesem Zeitpunkt der Embryo noch ausschließlich über Diffusion ernährt wird, kann eine Funktionsstörung der Plazenta nicht die Ursache für das frühe Absterben der Tiere sein. Vermutlich findet bereits nach der Implantation eine völlig gestörte Plazentaentwicklung statt, die die weitere Entwicklung der Embryonen unterbindet (Schnichels et al., 2007). Der Phänotyp der  $Cx31F137L/F137L$  Maus ähnelt dem Phänotyp der  $AP-2\gamma$  defizienten Maus.  $AP-2\gamma$  defizienten Mäuse zeigen ebenfalls eine Entwicklungsstörung der Plazentaanlage, die zum Tode der Embryonen zwischen den Tagen E7 und E9 führt (Werling und Schorle, 2002). Da in den vorausgehenden Versuchen bereits ein zellbiologischer Zusammenhang zwischen dem Cx31 Kanal und dem AP-2 $\gamma$  Protein vermutet wurde, soll auch hier untersucht werden, ob der Transkriptionsfaktor und das Strukturprotein in einer koordinierten Weise das TS-Zellverhalten steuern. Die heterozygoten Tiere wurden mit einer ungefähren Mendelschen Häufigkeit geboren, während

die homozygoten Tiere wegen des oben erwähnten Phänotyps nicht beobachtet werden konnten. Die Plazenten und die Embryonen der heterozygoten Tiere wurden an den Tagen 12.5 pc und 14.5 pc näher untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Plazentengewichte der WT und der *Cx31<sup>+</sup>/F137L* Mäuse keine Unterschiede aufwiesen. Interessanterweise war das Gewicht der Embryonen der *Cx31<sup>+</sup>/F137L* Mäuse an Tag 12.5 pc jedoch signifikant reduziert. Diese Reduktion der Embryonengewichte könnte auf einen Defekt in der metabolischen Funktion oder auf eine Fehldifferenzierung der Plazenta hinweisen. Diese Gewichtsreduktion wurde bis zum Tag 14.5 pc jedoch wieder kompensiert, so dass wohl nur eine transiente Störung/ Unterernährung der Embryonen während der Embryonalentwicklung vorlag. Die histologische Schnitte der 12.5 pc Plazenten zeigten den typischen Aufbau einer Plazenta: das Labyrinth und der Spongiotrophoblast wurden ausgebildet und auch die Anzahl der Trophoblast-Riesenzellen entsprach dem WT. In ersten morphometrischen Messungen konnte gezeigt werden, dass die Labyrinthschichten der mutierten Plazenten jedoch eine viel kompaktere Struktur aufwiesen. Dieses korrelierte mit einer kleineren beobachteten durchschnittlichen Fläche der plazentaren Sinusoide. Dergleichen zeigte auch der Spongiotrophoblast reduzierte Lakunen, die für die maternale Blutzufuhr verantwortlich sind (Yvonne Koch, persönliche Mitteilung). Diese kompaktere Labyrinth- und Spongiotrophoblaststruktur konnte auch bei der 14.5 pc Plazenta beobachtet werden. Diese veränderte Morphologie des Labyrinthes und des Spongiotrophoblasten in der *Cx31<sup>+</sup>/F137L* Plazenta ist möglicherweise der Grund für die Unterernährung/Gewichtsreduktion des Embryos, die am Tag 12.5 pc detektiert werden konnte.

Weiterhin wurde untersucht, ob die *Cx31F137L* Punktmutation einen transdominanten Effekt auf die anderen co-exprimierten Connexine (*Cx26*, *Cx31*, *Cx43* und *Cx31.1*) in der Plazenta besitzt. Es wurden jedoch keine Unterschiede zwischen den Expressionen der Connexine in der WT Plazenta und der *Cx31<sup>+</sup>/F137L* Plazenta beobachtet. Die *Cx31.1* Expression konnte in der vorliegenden Arbeit leider nicht erfasst werden. Es muss jedoch beachtet werden, dass der transdominante Effekt der Mutation nur auf mRNA Ebene untersucht worden ist, genauere Aussagen jedoch nur auf Proteinebene gemacht werden können. Schnichels et al. (2007) konnten in der Epidermis der *Cx31<sup>+</sup>/F137L* Mäuse zeigen, dass hier das mutierte Protein keinen Einfluss auf die anderen co-exprimierten Connexine (*Cx26*, *Cx30*, *Cx30.3*, *Cx31* und *Cx43*) besaß, da ein nahezu unverändertes Protein Expressionsniveau beobachtet werden konnte. Eine Unterscheidung zwischen dem mutierten *Cx31* und den WT *Cx31* konnte hierbei jedoch nicht stattfinden, da die Mutation innerhalb der Membran liegt und für die Herstellung von Antikörpern generell jedoch extra- oder intrazellulär liegende Aminosäuresequenzen verwendet werden. Schnichels et al. (2007) diskutierte über sog. Markerproteine, wie z.B. eGFP oder eYFP, die für die Unterscheidung der beiden Proteine



eingesetzt werden könnten. Da hier jedoch eine Wirkung dieser Markierungen auf die Funktion des Connexins nicht ausgeschlossen werden könnte, ist auch dieser Ansatz nicht klärend.

Der Phänotyp der *Cx31<sup>+/F137L</sup>* Plazenta ähnelt dem Phänotyp der *Cx31.1* defizienten Plazenta. Auch hier konnte ein Spongiotrophoblast beobachtet werden, der vergleichend zum WT eine kompaktere Struktur mit einer geringeren Anzahl von Lakunen aufwies. Außerdem zeigte das Labyrinth maternale Sinusoide, die vergleichend zum WT einen geringeren Durchmesser hatten, während die fetalen Gefäße jedoch einen größeren Durchmesser aufwiesen (Zheng-Fischhöfer et al., 2007). Die *Cx31.1* defizienten Mäuse zeigten im homozygoten Zustand zwischen den Tagen 11.5 pc und 14.5 pc eine 30%-ige Absterberate der Embryonen.

Die homozygote *Cx31F137L/F137L* Mutation, die zu einem 100%-igen Absterben führt, wirkt sich somit effektiver auf die Entwicklung der murinen Plazenta aus, als das nahe verwandte *Cx31.1*, welches wahrscheinlich während der Evolution durch Genduplikation entstanden ist (Hennemann et al., 1992). Sogar der komplette Verlust des Cx31 Kanals, der zu einer Dysmorphogenese der Plazenta führt, zeigte ein Absterben von nur 60% der Embryonen (Plum et al., 2001). Es stellt sich die Frage, warum sich nun der absolute Verlust des Cx31 Kanals geringfügiger auf die Entwicklung der Plazenta auswirkt, als die homozygote Punktmutation? Eventuell könnten andere Connexine bei den *Cx31* defizienten Mäusen die Funktionen des Cx31 Proteins übernehmen, zu denen u.a. auch die Interaktionen mit spezifischen Bindungspartnern gehören. Eine Simulation der Transmembrandomänenstruktur zeigte, dass die Punktmutation zu einer um eine Aminosäure verlängerte Transmembrandomäne 3 führte, was die zytoplasmatische Schleife um eine Aminosäure verkürzte (Schnichels et al., 2007). Dieses könnte Auswirkungen auf die Interaktionen mit den spezifischen Bindungspartnern, aber auch zu einer strukturellen Veränderung der Kanalpore führen. Die Beeinflussung der Kanalfunktion des Cx31 durch die Mutation konnte anhand von HeLa-Zellen gezeigt werden. Hier wirkte sich die *Cx31F137L* Mutation, wahrscheinlich durch die Ausbildung konstitutiv offener Halbkanäle, die die Aufrechterhaltung des Konzentrationsgradienten der Zellen zum umgebenden Medium unmöglich macht, toxisch aus (He et al., 2005). Einen toxischen Effekt auf HeLa-Zellen konnte auch für die *Cx31G12R* Punktmutation (Austausch von Glycin gegen Argenin) gezeigt werden, die vermutlich zu einem defekten Kanalschließungsmechanismus führt (Diestel et al., 2002). Für die *Cx31R42P* Punktmutation (Austausch von Argenin gegen Prolin) wurde anhand von Keratinozyten und Fibroblasten ein fehlerhafter Transport der Proteine zur Plasmamembran beschrieben (Di et al., 2002).

Schnichels et al. (2007) generierten auch *Cx31<sup>-</sup>/F137L* Mäuse, die nur monoallelisch die Punktmutation tragen und denen das normale Cx31 Gen fehlt. Diese Tiere wurden jedoch in

der Mendelschen Verteilung geboren und zeigten keine makroskopischen Auffälligkeiten. Daran lässt sich zeigen, dass erst das Vorhandensein des WT *Cx31* und des punktmutierten *Cx31* Auslöser des oben beschriebenen Phänotyps ist. Eventuell führt diese Kombination zu toxischen Proteinaggregaten, die dann die Entwicklung der Plazenta beeinflussen. Da das doppelte Vorhandensein des punktmutierten Gens dann zu einem 100%-igen Absterben der Embryonen führt, wird ein Gendosisseffekt vermutet (Schnichels et al., 2007).

Da in *Cx31* defizienten TS-Zellen eine Reduktion der *AP-2γ* Expression beobachtet werden konnte, besteht nun ein Interesse, den Einfluss der *Cx31F137L* Punktmutation auf die *AP-2γ* Expression zu untersuchen. Dieses soll weitere Aufschlüsse über die Faktoren und Signalkaskaden geben, die einen Einfluss auf die Entwicklung der Plazenta besitzen. Aus diesem Grunde sollen nun in zukünftigen Projekten TS-Zellen etabliert werden, die diese Punktmutation im *Cx31* Gen enthalten. Aufgrund der frühen Lethalität der *Cx31F137L/F137L* Mutation sollen gefloxe Mausmutanten verwendet werden, die erst nach der Zugabe der Cre-Rekombinase die *Cx31F137L* Punktmutation exprimieren.

## 5 Zusammenfassung

Die Plazenta ist das erste Organ, das während der Embryonalentwicklung der Säugetiere gebildet wird. Sie gewährleistet die Versorgung des Embryos mit Nährstoffen und Sauerstoff bei gleichzeitiger Entsorgung der Stoffwechselendprodukte. Außerdem synthetisiert sie eine Reihe von Hormonen, die für die Erhaltung der Schwangerschaft essentiell sind.

In den letzten Jahren konnten eine Reihe von Faktoren identifiziert werden, die eine wichtige Rolle bei der Entwicklung und der Funktion der Plazenta spielen. So konnte u.a. gezeigt werden, dass die anfänglich niedrige Sauerstoffkonzentration, die der sich entwickelnde Embryo vor der Implantation im Uterus der Mutter ausgesetzt ist, die Differenzierung der frühen Trophoblastzelllinie beeinflusst. Mit Hilfe von etablierten Trophoblast-Stammzellen wurde in der vorliegenden Arbeit nun der Einfluss einer hypoxischen Umgebung auf das Differenzierungsverhalten von TS-Zellen näher untersucht. Die TS-Zellen, die aus 3.5 dpc alten Blastozysten von Mäusen generiert wurden, sind ein geeignetes Modell zur zell- und molekularbiologischer Analyse der Plazentation.

Es konnte gezeigt werden, dass die TS-Zellen, die unter Hypoxie kultiviert worden sind, ihre proliferative Aktivität und ihr Stammzellpotential vorzeitig verloren haben und verstärkt in die Differenzierung eingetreten sind. Dabei wurde die Differenzierung in Richtung der Spongiotrophoblastzelllinie und der Trophoblast-Riesenzellen stark gefördert, während der Differenzierungsweg in Richtung des labyrinthären Trophoblasten tendenziell reprimiert war. Zellreaktionen, die durch Hypoxie ausgelöst werden, werden zumeist durch die HIF- $\alpha$  Proteine induziert. HIF- $\alpha$  Proteine, welche unter normoxischen Bedingungen abgebaut werden, werden unter Hypoxie stabilisiert und dimerisieren mit dem ARNT-Komplex, was zur Induktion spezieller Zielgene führt. In WT TS-Zellen zeigte das HIF-1 $\alpha$  Protein ebenfalls eine durch Hypoxie (3% O<sub>2</sub>) bedingte Stabilisierung. Versuche mit dem Prolylhydroxylaseninhibitor DMOG, der zu einer Stabilisierung der HIF- $\alpha$  Proteine unter normoxischen Bedingungen führt, ergaben ein vergleichbares Differenzierungsprofil der TS-Zellen.

Auch die direkte Kommunikation über Gap Junction Kanäle spielt bei der Plazentaentwicklung /-funktion eine wichtige Rolle. Dabei ist Cx31 das spezifische Connexin für den diploiden, proliferierenden Trophoblasten der frühen plazentaren Anlage. Der Verlust des Cx31 Proteins führt zu einer transienten plazentaren Dysmorphogenese der Plazenta, die mit einem 60%-igen Absterben der Embryonen verbunden ist. Anhand von Cx31 defizienten TS-Zellen konnte gezeigt werden, dass das Cx31 für die Erhaltung des Stammzellpotentials verantwortlich ist, da die Cx31 defizienten TS-Zellen eine um 2 Tage beschleunigte Differenzierung in Richtung der Trophoblast-Riesenzellen aufweisen. Es stellte sich nun die Frage, ob Cx31 in die durch Hypoxie induzierten

Differenzierungsreaktionen der TS-Zellen involviert ist bzw. ob der Verlust des *Cx31* unter hypoxischen Bedingungen zu synergistischen Effekten führt. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die frühen Differenzierungsschritte der TS-Zelllinien und die Differenzierung in Richtung des labyrinthären Trophoblasten nicht durch den Verlust des *Cx31* beeinflusst werden, während jedoch die unter Hypoxie bedingte Förderung des Spongiotrophoblasten nicht mehr beobachtet werden konnte. Auch das Expressionslevel des TGC-Markers *Pl-1* in den hypoxisch kultivierten *Cx31* defizienten TS-Zellen war nun vergleichbar mit den Expressionslevel in den normoxisch kultivierten *Cx31* defizienten TS-Zellen. Dieses lässt vermuten, dass der Verlust des *Cx31* Kanals unter Hypoxie zu einer Direkt Differenzierung der Stammzellen in die Trophoblast-Riesenzellen führt.

Interessanterweise wurde in den *Cx31* defizienten TS-Zellen eine Reduktion des Transkriptionsfaktors *AP-2γ*, für den schon durch vorausgegangenen Studien ein zellbiologischer Zusammenhang mit *Cx31* vermutet worden ist, beobachtet werden. Diese Daten lassen vermuten, dass *Cx31* und *AP-2γ* in einer Signalkaskade involviert sind, die für die Proliferation und die Differenzierung der Trophoblastzelllinie von Bedeutung ist.

Neben den Untersuchungen an *Cx31* defizienten TS Zellen wurde in der vorliegenden Arbeit eine erste Phänotypanalyse der Plazenten aus *Cx31<sup>+/F137L</sup>* Mäusen durchgeführt. Diese Mäuse, die an der Stelle 137 im *Connexin31* Gen eine Punktmutation aufweisen, die zu einem Austausch von Phenylalanin (F) gegen ein lipophiles Leucin (L) führt, sind von Schnichels et al. (2007) als Modell für die humane Hautkrankheit *Erythrokeratoderma variabilis* generiert worden. Interessanterweise führte diese Punktmutation bei homozygoten Tieren kurz nach der Implantation zum Absterben. Dieser Phänotyp ähnelt dem Phänotyp der *AP-2γ* defizienten Maus. Somit konnte auch hier wieder ein Zusammenhang zwischen *AP-2γ* und *Cx31* vermutet werden. Bereits heterozygote Tiere zeigten eine Gewichtsreduktion der Embryonen an Tag E12.5, die an Tag 14.5 jedoch wieder kompensiert war. Eine erste Phänotypanalyse der Plazenten der *Cx31<sup>+/F137L</sup>* Mäuse zeigte, dass das Labyrinth und der Spongiotrophoblast eine kompaktere Struktur aufwiesen, welches auf geringere Durchmesser der plazentaren Sinusoiden des Labyrinthes und der maternalen Lakunen im Spongiotrophoblast zurückzuführen war. Eine Auswirkung der Mutation auf die Expression der anderen plazentaren Connexine *Cx26*, *Cx31* und *Cx43* konnte auf mRNA Ebene nicht beobachtet werden. In zukünftigen Arbeiten sollen nun gefloxe als auch ungefloxe TS-Zellen, die diese Punktmutation im *Cx31* - Gen enthalten, etabliert werden. Anhand dieser TS-Zellen sollen weitere Aufschlüsse über Signalkaskaden und Faktoren, die die Plazentation beeinflussen, gewonnen werden.

## 6 Literaturverzeichnis

- Adamson SL, Lu Y, Whiteley KJ, Holmyard D, Hemberger M, Pfarrer C, Cross JC** (2002) Interactions between trophoblast cells and the maternal and fetal circulation in the mouse placenta. *Dev. Biol.* 250(2):358-73.
- Adelman DM, Gertsenstein M, Nagy A, Simon MC, Maltepe E** (2000) Placental cell fates are regulated in vivo by HIF-mediated hypoxia responses. *Genes Dev.* 14(24):3191-203.
- Adelman DM, Maltepe E, Simon MC** (1999) Multilineage embryonic hematopoiesis requires hypoxic ARNT activity. *Genes Dev.* 13(19):2478-83.
- Anson-Cartwright L, Dawson K, Holmyard D, Fisher SJ, Lazzarini RA, Cross JC** (2000) The glial cells missing-1 protein is essential for branching morphogenesis in the chorioallantoic placenta. *Nat. Genet.* 25(3):311-4.
- Appelhoff RJ, Tian YM, Raval RR, Turley H, Harris AL, Pugh CW, Ratcliffe PJ, Gleadle JM** (2004) Differential function of the prolyl hydroxylases PHD1, PHD2 and PHD3 in the regulation of hypoxia-inducible factor. *J. Biol. Chem.* 279(37):38458-65.
- Auman HJ, Nottoli T, Lakiza O, Winger Q, Donaldson S, Williams T** (2002) Transcription factor AP-2gamma is essential in the extra-embryonic lineages for early postimplantation development. *Development* 129:2733-47.
- Bardos JI, Ashcroft M** (2005) Negative and positive regulation of HIF-1: a complex network. *Biochim. Biophys. Acta.* 1755(2):107-20. Review.
- Barker DJ, Osmond C, Forsen TJ, Kajantie E, Eriksson JG** (2007) Maternal and social origins of hypertension. *Hypertension* 50:565-71.
- Barker DJ, Clark PM** (1997) Fetal undernutrition and disease in later life. *Rev. Reprod.* 2(2):105-12.
- Barker DJ.** (1995) Intrauterine programming of adult disease. *Mol. Med. Today* 1:418-23.
- Barlow PW, Sherman MI** (1972) The biochemistry of differentiation of mouse trophoblast: studies on polyploidy. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 27(2):447-65.
- Bennett MV, Barrio LC, Bargiello TA, Spray DC, Hertzberg E, Saez JC** (1991) Gap junctions: new tools, new answers, new questions. *Neuron.* 6:305-20.
- Beyer EC, Paul DL, Goodenough DA** (1987) Connexin43: a protein from rat heart homologous to a gap junction protein from liver. *J. Cell Biol.* 105:2621-9.
- Bladt F, Riethmacher D, Isenmann S, Aguzzi A, Birchmeier C** (1995) Essential role for the c-met receptor in the migration of myogenic precursor cells into the limb bud. *Nature* 376(6543):768-71.
- Brink P.** (2000) Gap junction voltage dependence. A clear picture emerges. *J. Gen. Physiol.* 116:11-12.

- Britz-Cunningham SH, Shah MM, Zuppan CW, Fletcher WH** (1995) Mutations of the Connexin43 gap-junction gene in patients with heart malformations and defects of laterality. *N.Eng.J.Med.* 332(20):1323-9.
- Brügge K, Jelkmann W, Metzen E** (2007) Hydroxylation of hypoxia-inducible transcription factors and chemical compounds targeting the HIF- $\alpha$  hydroxylases. *Curr.Med.Chem.* 14(17):1853-62.
- Buhl S** (2008) Transkriptionsfaktor AP-2 $\gamma$  in der Entwicklung des Trophoblasts. *Dissertation der mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.*
- Caniggia I, Mostachfi H, Winter J, Gassmann M, Lye SJ, Kuliszewski M, Post M** (2000) Hypoxia-inducible factor-1 mediates the biological effects of oxygen on human trophoblast differentiation through TGF $\beta$ 3. *J.Clin. Invest.* 105(5):577-87.
- Carney EW, Prideaux V, Lye SJ, Rossant J** (1993) Progressive expression of trophoblast-specific genes during formation of mouse trophoblast giant cells in vitro. *Mol. Reprod. Dev.* 34(4):357-68.
- Chambers I, Colby D, Robertson M, Nichols J, Lee S, Tweedie S, Smith A** (2003) Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell* 113:643-655
- Chawengsaksophak K, James R, Hammond VE, Kontgen F, Beck F** (1997) Homeosis and intestinal tumours in Cdx2 mutant mice. *Nature* 386:84-7.
- Copp AJ** (1978) Interaction between inner cell mass and trophoblast of the mouse blastocyst. I. A study of cellular proliferation. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 48:109-25.
- Cowden Dahl KD, Fryer BH, Mack FA, Compornelle V, Maltepe E, Adelman DM, Carmeliet P, Simon MC** (2005) Hypoxia-inducible factors 1 $\alpha$  and 2 $\alpha$  regulate trophoblast differentiation. *Mol. Cell Biol.* 25(23):10479-91.
- Cross JC, Baczyk D, Dobric N, Hemberger M, Hughes M, Simmons DG, Yamamoto H, Kingdom JC** (2003) Genes, development and evolution of the placenta. *Placenta* 24(2-3):123-30.
- Cross JC, Hemberger M, Lu Y, Nozaki T, Whiteley K, Masutani M, Adamson SL** (2002) Trophoblast functions, angiogenesis and remodeling of the maternal vasculature in the placenta. *Mol. Cell. Endocrinol.* 187(1-2):207-12.
- Cross JC** (2000) Genetic insights into trophoblast differentiation and placental morphogenesis. *Semin. Cell. Dev. Biol.* 11(2):105-13.
- Cross JC, Werb Z, Fisher SJ** (1994) Implantation and the placenta: key pieces of the development puzzle. *Science.* 266:1508-18.

- Dahl E, Winterhager E, Reuss B, Traub O, Butterweck A, Willecke K** (1996) Expression of the gap junction proteins connexin31 and connexin43 correlates with communication compartments in extraembryonic tissues and in the gastrulating mouse embryo, respectively. *J. Cell. Sci.* 109:191-7.
- Davies TC, Barr KJ, Jones DH, Zhu D, Kidder GM** (1996) Multiple members of the connexin gene family participate in preimplantation development of the mouse. *Dev. Genet.* 18(3):234-43.
- DeSousa PA, Valdimarsson G, Nicholson BJ, Kidder GM** (1993) Connexin trafficking and the control of gap junction assembly in mouse preimplantation embryos. *Development* 117:1355-67.
- Desoye G.** (2003) Die Plazenta bei pathologischen Schwangerschaften. *J. Fertil. Reprod.* 13(4):26-33.
- Di WL, Monypenny J, Common JE, Kennedy CT, Holland KA, Leigh IM, Rugg EL, Zicha D, Kelsell DP** (2002) Defective trafficking and cell death is characteristic of skin disease-associated connexin 31 mutations. *Human. Mol. Genet.* 11:2005-14
- Diestel S, Richard G, Doring B, Traub O** (2002): Expression of a connexin31 mutation causing erythrokeratoderma variabilis is lethal for HeLa cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 296:721-8.
- Durani BK, Hartschuh W.** (2007) Verruciform hyperkeratosis of the right lateral plantar foot. *J. Dtsch. Dermatol. Ges.* 5(5):417-8.
- El-Hashash AH, Esbrit P, Kimber SJ** (2005) PTHrP promotes murine secondary trophoblast giant cell differentiation through induction of endocycle, upregulation of giant-cell-promoting transcription factors and suppression of other trophoblast cell types. *Differentiation* 73(4):154-74.
- Erlebacher A, Price KA, Glimcher LH** (2004) Maintenance of mouse trophoblast stem cell proliferation by TGF-beta/activin. *Dev. Biol.* 275(1):158-69.
- Fandrey J, Gorr TA, Gassmann M** (2006) Regulating cellular oxygen sensing by hydroxylation. *Cardiovasc. Res.* 71(4):642-51.
- Francis D, Stergiopoulos K, Ek-Vitorin JF, Cao FL, Taffet SM, Delmar M** (1999) Connexin diversity and gap junction regulation by pH. *Dev. Genet.* 24:123-36.
- Fryer BH, Simon MC** (2006) Hypoxia, HIF and the placenta. *Cell Cycle* 5(5):498-8.
- Fu CT, Bechberger JF, Ozog MA, Perbal B, Naus CC** (2004) CCN3 (NOV) interacts with connexin43 in C6 glioma cells: possible mechanism of connexin - mediated growth suppression. *J. Biol. Chem.* 279:36943-50.
- Gabriel HD, Jung D, Butzler C, Temme A, Traub O, Winterhager E, Willecke K** (1998) Transplacental uptake of glucose is decreased in embryonic lethal connexin26-deficient mice. *J. Cell. Biol.* 140(6):1453-61.

- Gaglioti S, Scavone C, Bevilacqua E** (2000) Participation of the mouse implanting trophoblast in nitric oxide production during pregnancy. *Biol. Reprod.* 62(2):260-8.
- Gardner RL, Davies TJ** (1993) Lack of coupling between onset of giant transformation and genome endoreduplication in the mural trophectoderm of the mouse blastocyst. *J. Exp. Zool* 265(1):54-60.
- Gardner RL, Johnson MH** (1972) An investigation of inner cell mass and trophoblast tissues following their isolation from the mouse blastocyst. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 28(2):279-312.
- Gellhaus A, Dong X, Propson S, Maass K, Klein-Hitpass L, Kibschull M** (2004) Connexin43 interacts with NOV: a possible mechanism for negative regulation of cell growth in choriocarcinoma cells. *J. Biol. Chem.* 279:36931-42.
- Gellhaus A** (2003) Einfluss verschiedener Gap Junction-Kanäle auf das Proliferations-, Invasions- und Differenzierungsverhalten der humanen Chorionkarzinomzelllinie Jeg3. *Dissertation. Universität Duisburg-Essen.*
- Genbacev O** (2001) To proliferate or to divide – to be or not to be. *Early pregnancy* 5(1):67-9.
- Genbacev O, Zhou Y, Ludlow JW, Fisher SJ** (1997) Regulation of human placental development by oxygen tension. *Science* 277(5332):1669-72.
- Gibson NJ** (2006) The use of real-time PCR methods in DNA sequence variation analysis. *Clin. Chim. Acta.* 363(1-2):32-47.
- Giepman, BN** (2004) Gap junctions and connexin-interacting proteins. *Cardiovasc. Res.* 62:228-32.
- Gong X, Agopian K, Kumar NM, Gilula NB** (1999) Genetic factors influence cataract formation in alpha 3 connexin knockout mice. *Dev. Genet.* 24(1-2):27-32.
- Goodenough DA, Dick JS 2<sup>nd</sup>, Lyons JE** (1980) Lens metabolic cooperation: a study of mouse lens transport and permeability visualized with freeze-substitution autoradiography and electron microscopy. *J. Cell.Biol.* 86(2):576-89.
- Goodenough DA** (1976) In vitro formation of gap junction vesicles. *J. Cell Biol.* 68:220-31.
- Graevendieck T** (2008) Untersuchungen zum Zellkommunikationsprotein Connexin31 in Trophoblast-Stammzellen aus *Mus musculus*. *Dissertation. Universität Duisburg-Essen*
- Graham CH, Postovit LM, Park H, Canning MT, Fitzpatrick TE** (2000) Adriana and Luisa Castelluci award lecture 1999: role of oxygen in the regulation of trophoblast gene expression and invasion. *Placenta* 21(5-6):443-50.
- Guillemot F, Nagy A, Auerbach A, Rossant J, Joyner AL** (1994) Essential role of Mash-2 in extraembryonic development. *Nature* 371(6495):333-6.



- Gultice AD, Kulkarni-Datar K, Brown TL** (2009) Hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF1A) mediates distinct steps of rat trophoblast differentiation in gradient oxygen. *Biol. Reprod.* 80(1):184-93.
- Gultice AD, Selesniemi KL, Brown TL** (2006) Hypoxia inhibits differentiation of lineage-specific Rcho-1 trophoblast giant cells. *Biol. Reprod.* 74(6):1041-50.
- Guzman-Ayala M, Ben-Haim N, Beck S, Constam DB** (2004) Nodal protein processing and fibroblast growth factor 4 synergize to maintain a trophoblast stem cell microenvironment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101(44):15656-60.
- Harvey AJ, Kind KL, Pantaleon M, Armstrong DT, Thompson JG** (2004) Oxygen-regulated gene expression in bovine blastocysts. *Biol. Reprod.* 71(4):1108-19.
- Hayashi M, Sakata M, Takeda T, Tahara M, Yamamoto T, Okamoto Y, Minekawa R, Isobe A, Ohmichi M, Tasaka K, Murata Y** (2005) Up-regulation of c-met protooncogene product expression through hypoxia-inducible-factor-1alpha is involved in trophoblast invasion under low-oxygen tension. *Endocrinology* 146(11):4682-9.
- He LQ, Liu Y, Cai F, Tan ZP, Pan Q, Liang DS, Long ZG, Wu LQ, Huang LQ, Dai HP, Xia K, Xia JH, Zhang ZH** (2005) Intracellular distribution, assembly and effect of disease-associated connexin 31 mutants in HeLa cells. *Acta. Biochim. Biophys. Sin.* 37:547-554.
- He Y, Smith SK, Day KA, Clark DE, Licence DR, Charnock-Jones DS** (1999) Alternative splicing of vascular endothelial growth factor (VEGF)-R1 (FLT-1) pre-mRNA is important for the regulation of VEGF activity. *Mol. Endocrinol.* 13(4):537-45.
- Heazell AE, Lacey HA, Jones CJ, Huppertz B, Baker PN, Crocker IP** (2008) Effect of oxygen on cell turnover and expression of regulators of apoptosis in human placental trophoblast. *Placenta* 29(2):175-86.
- Hemberger M** (2007) Epigenetic landscape required for placental development. *Cell. Mol. Life. Sci.* 64(18):2422-36.
- Hemberger M, Hughes M, Cross JC** (2004) Trophoblast stem cells differentiate in vitro into invasive trophoblast giant cells. *Dev. Biol.* 271(2): 362-71.
- Hemberger M, Nozaki T, Masutani M, Cross JC** (2003) Differential expression of angiogenic and vasodilatory factors by invasive trophoblast giant cells depending on depth of invasion. *Dev. Dyn.* 227(2):185-91.
- Hemberger M, Cross JC** (2001) Genes governing placental development. *Trends Endocrinol. Metab.* 12(4):162-8.

- Hennemann H, Dahl E, White JB, Schwarz HJ, Lalley PA, Chang S, Nicholson BJ, Willecke K** (1992) Two gap junction genes, connexin 31.1 and 30.3, are closely linked on mouse chromosome 4 and preferentially expressed in skin. *J. Biol. Chem.* 267(24):17225-33.
- Herve JC, Derangeon M, Bahbouhi B, Mesnil M, Sarrouilhe D** (2007) The connexin turnover, an important modulating factor of the level of cell-to-cell junctional communication: comparison with other integral membrane proteins. *J. Membr. Biol.* 217:21-33.
- Hinrichsen KV** (1990) Human-Embryologie. *Springer-Verlag Berlin Heidelberg*
- Hoffman LH, Wooding FB** (1993) Giant and binucleate trophoblast cells of mammals. *J. Exp. Zool.* 266(6): 559-77.
- Houghton FD, Barr KJ, Walter G, Gabriel HD, Grummer R, Traub O, Leese HJ, Winterhager E, Kidder GM** (2002) Functional significance of gap junctional coupling in preimplantation development. *Biol. Reprod.* 66(5):1403-12.
- Hughes M, Dobric N, Scott IC, Su L, Starovic M, St-Pierre B, Egan SE, Kingdom JC, Cross JC** (2004) The HAND1, Stra13, and Gcm1 transcription factor override FGF signaling to promote terminal differentiation of trophoblast stem cells. *Dev. Biol.* 271(1): 26-37.
- Ingraham HA, Albert VR, Chen RP, Crenshaw 3rd EB, Elsholtz HP, He X, Kapiloff MS, Mangalam HJ, Swanson LW, Treacy MN et al.** (1990) A family of POU-domain and Pit-1 tissue-specific transcription factors in pituitary and neuroendocrine development. *Annu. Rev. Physiol.* 52:773-91.
- Janot M, Kibschull M, Gabriel HD, Winterhager E** (2003) AP-2 Transkriptionsfaktoren zeigen eine zellspezifische Regulation des Cx31-Gens. *Posterpräsentation zum Forschungstag des Universitätsklinikum Essen.*
- Janßen, Yvonne** (2003) Cyr61: Ein durch Östrogen reguliertes Markergen der Endometriose. *Dissertation. Universität Duisburg-Essen*
- Jansson T, Powell TL** (2007) Role of the placenta in fetal programming: underlying mechanisms and potential interventional approaches. *Clin. Sci.* 113:1-13.
- Jiang JX, Goodenough DA** (1996) Heteromeric connexons in lens gap junction channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:1287-91.
- Kalimi GH, Lo CW** (1989) Gap junctional communication in the extraembryonic tissues of the gastrulating mouse embryo. *J. Cell. Biol.* 109:3015-26.
- Kanno Y, Loewenstein WR** (1964) Low-resistance coupling between gland cells. Some observations on intercellular contact membranes and intercellular space. *Nature* 201:194-5.

- Karin M** (1990) Transcriptional control and the integration of cell-autonomous and environmental cues during development. *Curr.Opin. Cell. Biol* 2(6):996-1002.
- Kenneth NS, Rocha S** (2008) Regulation of gene expression by hypoxia. *Biochem. J.* 414(1):19-29
- Kibschull M, Gellhaus A, Winterhager E** (2008) Analogous and unique functions of connexins in mouse and human placental development. *Placenta* 29:848-54
- Kibschull M, Magin TM, Traub O, Winterhager E** (2005) Cx31 and Cx43 double-deficient mice reveal independent functions in murine placental and skin development. *Dev. Dyn.* 233:853-63.
- Kibschull M, Nassiry M, Dunk C, Gellhaus A, Quinn JA, Rossant J et al.** (2004) Connexin31-deficient trophoblast stem cells: a model to analyze the role of gap junction communication in mouse placental development. *Dev. Biol.* 273:63-75.
- Kibschull M** (2004) Trophoblast-Stammzellen als Modell zur Analyse der Connexin vermittelten Signalwege in der Plazentaentwicklung der Maus. *Dissertation. Universität Duisburg-Essen.*
- Kidder GM, Winterhager E** (2001) Intercellular communication in preimplantation development: the role of gap junctions. *Front. Biosci.* 6:D731-6.
- Kozak KR, Abbott B, Hankinson O** (1997) ARNT-deficient mice and placental differentiation. *Dev. Biol.* 191(2):297-305.
- Kraut N, Snider L, Chen CM, Tapscott SJ, Groudine M** (1998) Requirement of the mouse *I-mfa* gene for placental development and skeletal patterning. *EMBO J.* 17(21):6276-88.
- Kruger O, Plum A, Kim JS, Winterhager E, Maxeiner S, Hallas G, Kirchhoff S, Traub O, Lamers WH, Willecke K** (2000) Defective vascular development in connexin 45-deficient mice. *Development* 127(19):4179-93.
- Kunath T, Arnaud D, Uy GD, Okamoto I, Chureau C, Yamanaka Y, Heard E, Gardner RL, Avner P, Rossant J** (2005) Imprinted x-inactivation in extra-embryonic endoderm cell lines from mouse blastocysts. *Dev.* 132:1649-61.
- Lando D, Peet DJ, Gorman JJ, Whelan DA, Whitelaw ML, Bruick RK** (2002) FIH-1 is an asparaginyl hydroxylase enzyme that regulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor. *Genes Dev.* 16(12):1466-71.
- Lash GE, Hornbuckle J, Brunt A, Kirkley M, Searle RF, Robson SC, Bulmer JN** (2007) Effect of low oxygen concentrations on trophoblast-like cell line invasion. *Placenta* 28(5-6):390-8.
- Lawrence TS, Beers WH, Gilula NB** (1978) Transmission of hormonal stimulation by cell-to-cell communication. *Nature* 272:501-6.

- Lee SJ, Talamantes F, Wilder E, Linzer DI, Nathans D** (1988) Trophoblastic giant cells of the mouse placenta as the site of proliferin synthesis. *Endocrinology* 122(5):1761-8.
- Leithe E, Rivedal E** (2007) Ubiquitination of gap junction proteins. *J. Membr. Biol.* 217(1-3):43-51.
- Lescisin KR, Varmuza S, Rossant J** (1988) Isolation and characterization of a novel trophoblast-specific cDNA in the mouse. *Genes Dev.* 2(12A):1639-46.
- Li Y, Behringer RR** (1998) Esx1 is an X-chromosome-imprinted regulator of placental development and fetal growth. *Nat. Genet.* 20(3):309-11.
- Linzer DI, Fisher SJ** (1999) The placenta and the prolactin family of hormones: regulation of the physiology of pregnancy. *Mol. Endocrinol.* 13(6):837-40.
- Lisy K, Peet DJ** (2008) Turn me on: regulating HIF transcriptional activity. *Cell Death Differ.* 15(4):642-9.
- Lo CW, Gilula NB** (1979) Gap junctional communication in the post-implantation mouse embryo. *Cell* 18(2):411-22.
- Ma GT, Soloveva V, Tzeng SJ, Lowe LA, Pfendler KC, Iannaccone PM, Kuehn MR, Linzer DI** (2001) Nodal regulates trophoblast differentiation and placental development. *Dev. Biol.* 236(1):124-35.
- Macari F, Landau M, Cousin P, Mevorah B, Brenner S, Panizzon R, Schorderet DF, Hohl D, Huber M** (2000) Mutation in the gene for connexin30.3 in a family with erythrokeratoderma variabilis. *Am. J. Hum. Genet.* 67:1296-301.
- MacAuley A, Cross JC, Werb Z** (1998) Reprogramming the cell cycle for endoreduplication in rodent trophoblast cells. *Mol. Biol. Cell.* 9(4):795-807.
- Mahon PC, Hirota K, Semenza GL** (2001) FIH-1: a novel protein that interacts with HIF-1alpha and VHL to mediate repression of HIF-1 transcriptional activity. *Genes. Dev.* 15(20):2675-86.
- Maltepe E, Krampitz GW, Okazaki KM, Red-Horse K, Mak W, Simon MC, Fisher SJ** (2005) Hypoxia-inducible factor-dependent histone deacetylase activity determines stem cell fate in the placenta. *Development* 132(15):3393-403.
- Maltepe E, Schmidt JV, Baunoch D, Bradfield CA, Simon MC** (1997) Abnormal angiogenesis and responses to glucose and oxygen deprivation in mice lacking the protein ARNT. *Nature* 386(6623):403-7.
- Maxwell PH, Wiesener MS, Chang GW, Clifford SC, Vaux EC, Cockman ME, Wykoff CC, Pugh CW, Maher ER, Ratcliff PJ** (1999) The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature* 399(6733):271-5.
- McConell J, Petrie L, Stennard F, Ryan K, Nichols J** (2005) Eomesodermin is expressed in mouse oocytes and pre-implantation embryos. *Mol. Reprod. Dev.* 71:399-404.

- Morasso MI, Grinberg A, Robinson G, Sargent TD, Mahon KA** (1999) Placental failure in mice lacking the homeobox gene *Dlx3*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96(1):162-7.
- Moreno AP, Lau AF** (2007) Gap Junction channel gating modulated through protein phosphorylation. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 94(1-2):107-19.
- Nakayama H, Liu Y, Stifani S, Cross JC** (1997) Developmental restriction of Mash-2 expression in trophoblast correlates with potential activation of the notch-2 pathway. *Dev. Genet.* 21(1):21-30.
- Nichols J, Zevnik B, Anastassiadis K, Niwa H, Klewe-Nebenius D, Chambers I, Scholer H, Smith A** (1998) Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell* 95:379-391.
- Niwa, H** (2007) How is pluripotency determined and maintained? *Dev.* 134:635-46.
- Niwa H, Toyooka Y, Shimosato D, Strumpf D, Takahashi K, Yagi R, Rossant J** (2005) Interaction between Oct3/4 and Cdx2 determines trophoblast differentiation. *Cell* 123:917-29.
- Niwa H, Miyazaki J, Smith AG** (2000) Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nature genetics* 24:372-76.
- Noci I, Borri P, Chieffi O, Scarselli G, Biagiotti R, Moncini D, Paglierini M, Taddei G** (1995) Aging of the human endometrium: a basic morphological and immunohistochemical study. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 63(2):181-5.
- Oztürk A, Donald LJ, Li L, Duckworth HW, Duckworth ML** (2006) Proteomic identification of AP2 gamma as a rat placental lactogen II trophoblast cell-specific enhancer binding protein. *Biochim. Biophys. Acta.* 1771(9):1186-94.
- Parr BA, Cornish VA, Cybulsky MI, McMahon AP** (2001) Wnt7b regulates placental development in mice. *Dev. Biol.* 237(2):324-32.
- Pauken CM, Lo CW** (1995) Nonoverlapping expression of Cx43 and Cx26 in the mouse placenta and decidua: a pattern of gap junction gene expression differing from that in the rat. *Mol. Reprod. Dev.* 41(2):195-203.
- Paul DL, Yu K, Bruzzone R, Gimlich RL, Goodenough DA** (1995) Expression of a dominant negative inhibitor of intercellular communication in the early *Xenopus* embryo causes delamination and extrusion of cells. *Development.* 121(2):371-81.
- Paul DL** (1986) Molecular cloning of cDNA for rat liver gap junction protein. *J. Cell Biol.* 103(1):123-34.
- Pepe GJ, Albrecht ED** (1999) Regulation of functional differentiation of the placental villous syncytiotrophoblast by estrogen during primate pregnancy. *Steroids* 64(9):624-7

- Peters TJ, Chapman BM, Wolfe MW, Soares MJ** (2000) Placental lactogen-I gene activation in differentiating trophoblast cells: extrinsic and intrinsic regulation involving mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *J. Endocrinol.* 165(2):443-56.
- Plum A, Winterhager E, Pesch J, Lautermann J, Hallas G, Rosentreter B, Traub O, Herberhold C, Willecke K** (2001) Connexin31-deficiency in mice causes transient placental dysmorphogenesis but does not impair hearing and skin differentiation. *Dev. Biol.* 231(2):334-47.
- Plum A, Hallas G, Magin T, Dombrowski F, Hagendorff A, Schumacher B, Wolpert C, Kim J, Lamers WH, Evert M, Meda P, Traub O, Willecke K** (2000) Unique and shared functions of different connexins in mice. *Curr. Biol.* 89(12):1108-18.
- Ralston A, Rossant J** (2008) Cdx2 acts downstream of cell polarization to cell-autonomously promote trophectoderm fate in the early mouse embryo. *Dev. Biol.* 313(2):614-29.
- Ralston A, Rossant J** (2005) Genetic regulation of stem cell origins in the mouse embryo. *Clin. Genet.* 68:106-112.
- Reaume AG, de Sousa PA, Kulkarni S, Langille BL, Zhu D, Davies TC, Juneja SC, Kidder GM, Rossant J** (1995) Cardiac malformation in neonatal mice lacking connexin43. *Science* 267:1831-4.
- Reuss B, Hellmann P, Traub O, Butterweck A, Winterhager E** (1997) Expression of connexin31 and connexin43 genes in early rat embryos. *Dev. Genet.* 21(1):82-90.
- Reuss B, Hellmann P, Dahl E, Traub O, Butterweck A, Grummer R, Winterhager E** (1996) Connexins and E-cadherin are differentially expressed during trophoblast invasion and placenta differentiation in the rat. *Dev. Dyn.* 205(2):172-82.
- Richard G, Brown N, Rouan F, Van der Schroeff JG, Bijlsma E, Eichenfield LF, Sybert VP, Greer KE, Hogan P, Campanelli C, Compton JG, Bale SJ, DiGiovanna JJ, Uitto J** (2003) Genetic heterogeneity in erythrokeratoderma variabilis: novel mutations in the connexin gene GJB4 (Cx30.3) and genotype-phenotype correlations. *J. Invest. Dermatol.* 120:601-9.
- Richard G, Smith LE, Terrinoni A, Melino G, Mackie RM, Bale SJ, Uitto J.** (2000) The spectrum of mutations in erythrokeratodermias – novel and de novo mutations in GJB3. *Hum. Genet.* 106:321-9.
- Richard G, Smith LE, Bailey RA, Itin P, Hohl D, Epstein EH Jr, DiGiovanna JJ, Compton JG, Bale SJ** (1998) Mutations in the human connexin gene GJB3 cause erythrokeratoderma variabilis. *Nat. Genet.* 20(4):366-9.
- Riley P, Anson-Cartwright L, Cross JC** (1998) The Hand1 bHLH transcription factor is essential for placentation and cardiac morphogenesis. *Nat. Genet.* 18(3):271-5.

- Robins JC, Heizer A, Hardiman A, Hubert M, Handwerger S** (2007) Oxygen tension directs the differentiation pathway of human cytotrophoblast cells. *Placenta* 28(11-12):1141-6.
- Rocha S** (2007) Gene regulation under low oxygen: holding your breath for transcription. *Trends Biochem. Sci.* 32(8):389-97.
- Rodesch F, Simon P, Donner C, Jauniaux E** (1992) Oxygen measurements in endometrial and trophoblastic tissues during early pregnancy. *Obstet. Gynecol.* 80(2):283-5.
- Rosario GX, Konno T, Soares MJ** (2008) Maternal hypoxia activates endovascular trophoblast cell invasion. *Dev. Biol.* 314(2):362-75.
- Rossant J, Cross JC** (2001) Placental development: lessons from mouse mutants. *Nat. Rev. Genet.* 2(7):538-48.
- Russ AP, Wattler S, Colledge WH, Aparicio SA, Carlton MB, Pearce JJ, Barton SC, Surani MA, Ryan K, Nehls MC, Wilson V, Evans MJ** (2000) Eomesodermin is required for mouse trophoblast development and mesoderm formation. *Nature* 404:95-9.
- Salceda S, Caro J** (1997) Hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) protein is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxic conditions. Its stabilization by hypoxia depends on redox-induced changes. *J. Biol. Chem.* 272(36):22642-7.
- Sapin V, Bouillet P, Oulad-Abdelghani M, Dastugue B, Chambon P, Dolle P** (2000) Differential expression of retinoic acid-inducible (Stra) genes during mouse placentation. *Mech. Dev.* 92(2):295-9.
- Schnichels M, Wörsdörfer P, Dobrowolski R, Makropoulos C, Kretz M, Schwarz G, Winterhager E, Willecke K** (2007) The connexin31 F137L mutant mouse as a model for the human skin disease erythrokeratoderma variabilis (EKV). *Hum. Mol. Genet.* 16(10):1216-24.
- Schnichels M** (2006) Erzeugung und Charakterisierung einer transgenen Maus als Tiermodell für die humane Erbkrankheit Erythrokeratoderma variabilis. *Dissertation der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.*
- Scott IC, Anson-Cartwright L, Riley P, Reda D, Cross JC** (2000) The HAND1 basic helix-loop-helix transcription factor regulates trophoblast differentiation via multiple mechanisms. *Mol. Cell. Biol.* 20(2):530-41.
- Semenza GL** (2007) Hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) pathway. *Sci. STKE* 2007(407):cm8. Review.

- Semenza GL, Agani F, Booth G, Forsythe J, Iyer N, Jiang BH, Leung S, Roe R, Wiener C, Yu A** (1997) Structural and functional analysis of hypoxia-inducible factor 1. *Kidney Int.* 51(2):553-5.
- Shi D, Kellems RE** (1998) Transcription factor AP-2gamma regulates murine adenosine deaminase gene expression during placental development. *J. Biol. Chem.* 273:27331-8.
- Simmons DG, Fortier AL, Cross JC** (2007) Diverse subtypes and developmental origins of trophoblast giant cells in the mouse placenta. *Dev. Biol.* 304(2):567-78.
- Simpson I, Rose B, Loewenstein WR** (1977) Size limit of molecules permeating the junctional membrane channels. *Science* 195:294-6.
- Söhl G, Willecke K** (2004) Gap junctions and the connexin protein family. *Cardiovasc. Res.* 62:228-32.
- Söhl G, Willecke K** (2003) An update on connexin genes and their nomenclature in mouse and man. *Cell Commun. Adhes.* 10:173-80.
- Strumpf D, Mao CA, Yamanaka Y, Ralston A, Chawengsaksophak K, Beck F, Rossant J** (2005) Cdx2 is required for correct cell fate specification and differentiation of trophectoderm in the mouse blastocyst. *Development* 132:2093-102.
- Sutherland A.** (2003) Mechanisms of implantation in the mouse: differentiation and functional importance of trophoblast giant cell behaviour. *Dev. Biol.* 258(2):241-51.
- Takeda K, Aguila HL, Parikh NS, Li X, Lamothe K, Duan LJ, Takeda H, Lee FS, Fong GH** (2008) Regulation of adult erythropoiesis by prolyl hydroxylase domain proteins. *Blood* 111(6):3229-35.
- Takeda K, Ho VC, Takeda H, Duan LJ, Nagy A, Fong GH** (2006) Placental but not heart defects are associated with elevated hypoxia-inducible factor alpha levels in mice lacking prolyl hydroxylase domain protein. *Mol. Cell Biol.* 26(22):8336-46.
- Takeda T, Sakata M, Isobe A, Yamamoto T, Nishimoto F, Minekawa R, Okamoto Y, Tasaka K, Murata Y** (1997) Hypoxia represses the differentiation of Rcho-1 rat trophoblast giant cells. *Gynecol. Obstet. Invest.* 63(4):188-94.
- Talamantes F, Ogren L** (1988) The placenta as an endocrine organ : polypeptides. In: Knobil E, Neill JD (eds) *The Physiology of Reproduction*. Raven Press, New York, vol 2: 2093-144.
- Tanaka S, Kunath T, Hadjantonakis AK, Nagy A, Rossant J** (1998) Promotion of trophoblast stem cell proliferation by FGF4. *Science* 282:2072-5.
- Tanaka M, Gertsenstein M, Rossant J, Nagy A** (1997) Mash2 acts cell autonomously in mouse spongiotrophoblast development. *Dev. Biol.* 190(1):55-65.
- Valdimarsson G, Kidder GM** (1995) Temporal control of gap junction assembly in preimplantation mouse embryos. *J. Cell. Sci.* 108:1715-22.



- Van Steensel M** (2004) Gap junction diseases of the skin. *Am. J. Med. Genet. C. Semin. Med. Genet.* 131C(1):12-9. Review. Erratum in: *Am. J. Med. Genet. C. Semin. Med. Genet.* 142(1):58.
- Vance MM, Wiley LM** (1999) Gap junction intercellular communication mediates the competitive cell proliferation disadvantage of irradiated mouse preimplantation embryos in aggregation chimeras. *Radiat. Res.* 152(5):544-51.
- Wang XG, Peracchia C** (1996). Connexin 32/38 chimeras suggest a role for the second half of inner loop in gap junction gating by low pH. *Am. J. Physiol.* 271:C1743-9.
- Weiler-Guettler H, Aird WC, Rayburn H, Husain M, Rosenberg RD** (1996) Developmentally regulated gene expression of thrombomodulin in postimplantation mouse embryos. *J. Clin. Invest.* 101(9):1863-91.
- Wenger RH** (2000) Mammalian oxygen sensing, signalling and gene regulation. *J. Exp. Biol.* 203(Pt8):1253-63.
- Werling U, Schorle H** (2002) Transcription factor gene AP-2gamma essential for early murine development. *Mol. Cancer Res.* 1(12):921-9.
- White TW, Goodenough DA, Paul DL** (1998) Targeted ablation of connexin50 in mice results in microphthalmia and zonular pulverulent cataracts. *J. Cell. Biol.* 143(3):815-25.
- Whitten WK, Champlin AK** (1978) Pheromones, estrus, ovulation and mating. *Methods in mammalian reproduction* (ed. J.C. Daniel): 403-17.
- Wiemers DO, Shao LJ, Ain R, Dai G, Soares MJ** (2003) The mouse prolactin gene family locus. *Endocrinology* 144(1):313-25.
- Wilgoss A, Leigh IM, Barnes MR, Dopping-Hepenstal P, Eady RA, Walter JM, Kenney CT, Kelsell DP** (1999) Identification of a novel mutation R42P in the gap junction protein beta-3 associated with autosomal dominant erythrokeratoderma variabilis. *J. Invest. Dermatol.* 113:1119-22.
- Willecke K, Eiberger J, Degen J, Eckardt D, Romualdi A, Guldenagel M, Deutsch U, Sohl G** (2002) Structural and functional diversity of connexin genes in the mouse and human genome. *Biol. Chem.* 383(5):725-37.
- Winterhager E** (2005) Gap Junctions in development and disease. Springer Verlag Berlin Heidelberg.
- Xu X, Weinstein M, Li C, Naski M, Cohen RI, Ornitz DM, Leder P, Deng C** (1998): Fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2)-mediated reciprocal regulation loop between FGF8 and FGF10 is essential for limb induction. *Development* 125(4):753-65.

- Yamamoto H, Flannery ML, Kupriyanov S, Pearce J, McKercher SR, Henkel GW, Maki RA, Werb Z, Oshima RG** (1998) Defective trophoblast function in mice with a targeted mutation of *Ets2*. *Genes Dev.* 12(9):1315-26.
- Yan J, Tanaka S, Oda M, Makino T, Ohgane J, Shiota K** (2001) Retinoic acid promotes differentiation of trophoblast stem cells to a giant cell fate. *Dev. Biol.* 235(2):422-32.
- Yotsumoto S, Shimada T, Cui CY, Nakashima H, Fujiwara H, Ko MS** (1998) Expression of adrenomedullin, a hypotensive peptide, in the trophoblast giant cells at the embryo implantation site in mouse. *Dev. Biol.* 203(2):264-75.
- Zheng-Fischhöfer Q, Kibschull M, Schnichels M, Kretz M, Petrasch-Parwez E, Strotmann J et al.** (2007) Characterization of connexin31.1-deficient mice reveals impaired placental development. *Dev. Dyn.* 233:853-63.
- Zhou Y, Fisher SJ, Janatpour M, Genbacev O, Dejana E, Wheelock M, Damsky CH** (1997) Human cytotrophoblasts adopt a vascular phenotype as they differentiate. A strategy for successful endovascular invasion? *J. Clin. Invest.* 99(9):2139-51.
- Zybina EV** (1970) Characteristic of polyploidization of trophoblast cells. *Tsitologiia* 12(9):1081-94.
- Zybina EV, Grishchenko TA** (1970) Polyploid cells of the trophoblast in various parts of the placenta of the white rat. *Tsitologiia* 12(5):585-95.

## 7 Anhang

### 7.1 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACTB	β-Aktin
AP-2γ / AP-2γ	Aktivator-Protein 2γ
ARNT	Aryl Hydrocarbon receptor nuclear translocator
bp	Basenpaare
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CCN	Cyr61/connective tissue growth factor/nephroblastoma-overexpressed
cDNA	komplementäre DNA
<i>Cdx2</i>	caudal-related homeobox 2
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
<i>c-Met</i>	mesenchymal-epithelial transition factor
Cx	Connexin
<i>Dlx3</i>	Distal less X3
DMOG	Dimethyloxaloylglycin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Dnase	Desoxyribonuklease
dpc	<i>dies post coitum</i> , Tage nach der Befruchtung
E	Tag der Embryonalentwicklung
EKV	Erythrokeratoderma variabilis
EMFI	embryonale Mausfibroblasten
<i>Eomes</i>	Eomesodermin
ES-Zellen	embryonale Stammzellen
<i>Ets2</i>	erythroblastosis virus oncogene homolog 2
FGF4	fibroblast growth factor 4
<i>Fgfr2</i>	fibroblast growth factor receptor 2
<i>Gcm1</i>	glial cells missing 1
GJ	Gap Junction membrane channel
h	Stunde
HIF	Hypoxia-inducible factor
HZ	heterozygot
ICM	inner cell mass
IP <sub>3</sub>	Inositoltriphosphat

---

kD	Kilodalton
KO	knocked out
LIF	Leukemia inhibitor factor
<i>Lifr</i>	Leukemia inhibitory factor receptor
<i>Mash2</i>	mammalian achaete scute homolog protein 2
mRNA	<i>messenger</i> RNA
<i>Oct4</i>	Octamer binding transcription factor 4
pc	<i>post coitum</i> , nach der Befruchtung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PHD	Prolylhydroxylasen
<i>Pl-1</i> / Pl-1	placental lactogen 1
<i>Pl-2</i> / PL-2	placental lactogen 2
pVHL	von-Hippel-Lindau Tumorsuppressorprotein
rER	rauhes endoplasmatisches Retikulum
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
siRNA	small interfering RNAs
Tab.	Tabelle
TE	Trophektoderm
TGC	trophoblast giant cells
TGF- $\beta$	transforming growth factor beta
<i>Tpbpa</i>	trophoblast specific binding protein a
TS-Zellen	Trophoblast-Stammzellen
U	Unit
WT	Wildtyp
XEN-Zellen	Zellen des extraembryonalen Endoderms
ZO-1	Zonula occludens 1 Protein

## 7.2 Abbildungsverzeichnis

Abb.1.1	Entwicklung der murinen Plazenta	2
Abb.1.2	Stammzelllinien aus der Blastozyste	8
Abb.1.3	Aufbau von Gap Junctions und Connexinen	11
Abb.1.4	Die <i>Cx31F137L</i> Punktmutation	17
Abb.1.5	Struktur der HIF Proteine	18
Abb.1.6	Regulation von HIF-1 $\alpha$ unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen	20
Abb.3.1	Proliferation von WT TS-Zelllinien unter Hypoxie	38
Abb.3.2	Die Expressionen der Stammzellmarker <i>Cdx2</i> und <i>Eomes</i> unter Stammzellbedingungen in WT TS-Zellen	39
Abb.3.3	Die Expressionen der Stammzellmarker <i>Cdx2</i> und <i>Eomes</i> während der Differenzierung von WT TS-Zellen unter normoxischen als auch unter hypoxischen Bedingungen	40
Abb.3.4	Die Expressionen der labyrinthären Marker <i>Gcm1</i> und <i>Cx26</i> während der Differenzierung von WT TS-Zellen unter normoxischen als auch unter hypoxischen Bedingungen	41
Abb.3.5	Die Expressionen der Spongiotrophoblastmarker <i>Mash2</i> , <i>Cx31</i> und <i>Tpbpa</i> während der Differenzierung von WT TS-Zellen unter normoxischen als auch unter hypoxischen Bedingungen	42
Abb.3.6	Die Expression der Trophoblast-Riesenzellmarker <i>AP-2<math>\gamma</math></i> und <i>Pl-1</i> während der Differenzierung von WT-TS Zellen unter normoxischen als auch unter hypoxischen Bedingungen	43
Abb.3.7	Morphologische Analyse der Trophoblast-Riesenzellen	45
Abb.3.8	Einfluss der Kultivierungsbedingungen auf das Differenzierungsverhalten der WT TS-Zellen	46
Abb.3.9	Proliferation von <i>Cx31</i> <sup>-/-</sup> TS-Zelllinien unter Hypoxie	47
Abb.3.10	Die Expressionen der Stammzellmarker <i>Cdx2</i> und <i>Eomes</i> während der Differenzierung von <i>Cx31</i> <sup>-/-</sup> TS-Zellen unter normoxischen als auch unter hypoxischen Bedingungen	48
Abb.3.11	Die Expressionen der labyrinthären Marker <i>Gcm1</i> und <i>Cx26</i> während der Differenzierung von <i>Cx31</i> <sup>-/-</sup> TS- Zellen unter normoxischen als auch unter hypoxischen Bedingungen	49
Abb.3.12	Die Expressionen der Spongiotrophoblastmarker <i>Mash2</i> und <i>Tpbpa</i> während der Differenzierung von <i>Cx31</i> <sup>-/-</sup> TS-Zellen unter normoxischen als auch unter hypoxischen Bedingungen	50

Abb.3.13	Die Expressionen des Transkriptionsfaktor <i>AP-2γ</i> in WT und <i>Cx31<sup>-/-</sup></i> TS-Zellen	51
Abb.3.14	Die Expression des Riesenzellmarkers <i>Pl-1</i> während der Differenzierung von <i>Cx31<sup>-/-</sup></i> TS-Zellen unter normoxischen als auch unter hypoxischen Bedingungen	52
Abb.3.15	Ermittelte Anzahl der TGCs in einer <i>Cx31<sup>-/-</sup></i> TS-Zellkultur	53
Abb.3.16	<i>Hif1α</i> Expression in undifferenzierten und differenzierten WT TS-Zellen	54
Abb.3.17	Western-Blot-Analyse zur Stabilisierung des HIF-1α Proteins in WT TS-Zellen	55
Abb.3.18	DMOG Vorversuche	56
Abb.3.19	Effekt von DMOG auf den Differenzierungsprozess von WT TS-Zellen	57
Abb.3.20	Genotypisierungen der Embryonen aus einer <i>Cx31<sup>+/F137L</sup></i> Verpaarung	59
Abb.3.21	Embryonen und Plazentagewichte aus <i>Cx31<sup>+/F137L</sup></i> Verpaarungen	60
Abb.3.22	Bestimmung von Labyrinthparametern von WT und <i>Cx31<sup>+/F137L</sup></i> Plazenten	61
Abb.3.23	Histologische Analyse von Wildtyp und <i>Cx31<sup>+/F137L</sup></i> Plazenten an Tag E12.5 pc	62
Abb.3.24	Histologische Analyse von Wildtyp und <i>Cx31<sup>+/F137L</sup></i> Plazenten an Tag E14.5 pc	63
Abb.3.25	Beeinflussung der Expressionen der Connexine <i>Cx26</i> , <i>Cx31</i> und <i>Cx43</i> in der <i>Cx31<sup>+/F137L</sup></i> Plazenta an Tag E14.5 pc	64
Abb.4.1	Einfluss von Hypoxie auf das Differenzierungsverhalten von WT und <i>Cx31<sup>-/-</sup></i> TS-Zellen	80

### 7.3 Tabellenverzeichnis

Tab.1.1	Schwangerschaftspathologien mit Beteiligung der Plazenta	1
Tab.1.2	Zusammenfassung der bisher bekannten Funktionen von Connexinen in der Maus	13
Tab.2.1	Verwendete Oligonukleotide, die sowohl für die RT-PCR als auch für die qRT-PCR verwendet wurden	26
Tab.2.2	Primersequenzen für die Genotypisierung	35
Tab.3.1	Einfluss der Hypoxie auf das Differenzierungsverhalten von WT und <i>Cx31</i> <sup>-/-</sup> TS-Zellen	53
Tab.3.2	Genotypenverhältnisse der Embryonen aus <i>Cx31</i> <sup>+/+</sup> / <i>F137L</i> Verpaarungen	59

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich bei der Durchführung dieser Doktorarbeit unterstützt haben!

Bei Frau Prof. Dr. E. Winterhager bedanke ich mich für die Überlassung des interessanten Promotionsthemas, sowie für die intensive fachliche Betreuung und der ständigen Diskussionsbereitschaft. Außerdem bedanke ich mich bei ihr für die Unterstützung bei der Stipendiumsbeantragung und für die Möglichkeit der Teilnahme an vielen Kongressen, auf denen ich meine Ergebnisse präsentieren konnte.

Dr. Mark Kibschull möchte ich danken für die Einführung in die Arbeit mit Trophoblast-Stammzellen, sowie für seine kompetente Betreuung, die trotz sehr weiter Entfernung funktioniert hat. Ebenso möchte ich mich bei Dr. Tina Graevendieck bedanken, die mich in der Anfangszeit der Promotionsarbeit so sehr unterstützt hat.

Herrn Prof. Dr. Stephen Lye danke ich dafür, dass ich zwei Monate in seinem Labor am Mount Sinai Hospital in Toronto, Kanada arbeiten durfte und dort die Generierung von Trophoblast-Stammzellen erlernt habe. Bei seinem ganzen Team möchte ich mich für die herzliche Aufnahme bedanken, sowie für die Einführung in die kanadische Barbecue-Kultur. Es war eine unvergessliche Zeit!!!

Ich danke allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Winterhager für das sehr gute Arbeitsklima. Es hat echt Spaß gemacht mit Euch zusammen zuarbeiten!

Verena Mönckedieck, Nadine Wolf, Jessica Wagener, Pia Riemke, Carolin Sannecke, Melanie Gemein und allen medizinischen Doktoranden möchte ich für die spaßigen und schönen Stunden im Labor danken, sowie auch für die schöne Zeit außerhalb der Arbeitszeit! Dr. Alexandra Gellhaus und Dr. Isabella Gashaw danke ich für die Hilfestellungen, die sie mir oftmals bei Problemen und Fragestellungen geleistet haben. Siegfried Moyrer danke ich für die Hilfe bei jeglichen Computerproblemen und Alex Carpinteiro für die erlebnisreiche Fahrgemeinschaft!

Monika Thomassen, Anna Knychas und Inken Sandermann danke ich für das Korrekturlesen dieser Arbeit. Nicole Reiners danke ich für die Bereitstellung ihres Laptops, der es mir ermöglicht hat, diese Arbeit auch mal außerhalb meiner Wohnung zu verfassen. Andreas Sandermann danke ich für die mehr oder minder erfolgreiche Doktorarbeitsschreib-AG.

Ebenso möchte ich mich hier bei allen meinen langjährigen Freunden bedanken, die mich immer wieder seelisch und moralisch unterstützt haben.

Ganz herzlich möchte ich mich auch bei meiner Familie bedanken, da sie mich immer in jeder Lebenslage unterstützt hat und ich mich einfach blind auf sie verlassen kann!

Die vorliegende Arbeit wurde von der Jürgen-Manchot-Stiftung in Düsseldorf und dem Kompetenznetzwerk Stammzellforschung NRW unter dem Projekttitel „The role of AP-2γ in trophectoderm stem cell maintenance with special focus on its potential downstream target connexin 31“ gefördert.



## Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name: Betina van Fürden  
Adresse: Kanonierstr. 14  
40476 Düsseldorf  
Geburtsdatum: 15.08.1977  
Geburtsort: Düsseldorf  
Familienstand: ledig

### Schulbildung

1984 – 1988      Grundschule in Düsseldorf  
1988 – 1997      Geschwister-Scholl-Gymnasium in Düsseldorf  
Abschluss: Abitur

### Hochschulausbildung

10/1997 – 06/2004    Studium der Biologie an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
Abschluss: Diplom-Biologin  
08/2003 – 06/2004    Diplomarbeit im Institut für Entwicklungs- und Molekularbiologie der  
Pflanzen der Heinrich-Heine-Universität zum Thema: „Einfluss von  
Methyljasmonat auf die Lignanakkumulation und Genexpression in  
Kulturen von *Linum album*“

### Sonstige Tätigkeiten

08/2004 – 10/2004    Praktikum im Kölner Zoo. Mitarbeit bei der Promotion „Ernährung des  
Slaters Maki in menschlicher Obhut“  
11/2004 – 12/2004    Praktikum in der Pressestelle der Heinrich-Heine-Universität  
Düsseldorf  
01/2005 - 06/2005    Angestellte in der Werbeagentur „The Style Council GmbH“ in  
Düsseldorf  
07/2005 – 08/2005    Praktikum im „Labor für Klinische und zelluläre Elektrophysiologie“ der  
Universität Köln  
seit 08/2005          Doktorandin in der Arbeitsgruppe von Prof. Winterhager (Institut für  
Molekularbiologie des Universitätsklinikums Essen)

Essen, den

Betina van Fürden

## Erklärung

Hiermit erkläre ich, gem. §6 Abs. 2, Nr. 8 der Promotionsordnung der Math.-Nat.-Fachbereiche zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „Untersuchungen zur Rolle von Connexin31 bei der murinen Plazentaentwicklung“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Frau Betina van Fürden befürworte.

Essen, den

Prof. Dr. E. Winterhager

### Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. §6 Abs. 2, Nr. 6 der Promotionsordnung der Math.-Nat.-Fachbereiche zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe.

Essen, den

Betina van Fürden

### Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. §6 Abs. 2, Nr. 7 der Promotionsordnung der Math.-Nat.-Fachbereiche zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe und dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät abgelehnt worden ist.

Essen, den

Betina van Fürden